ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ ต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ ทักษะ และ ทัศนคติ ของนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์

อุไรวรรณ วิจารณกุล

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

2543

รายงานการวิจัย

ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ ทักษะ และทัศนคติของนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์

The Effect of Laboratory Approach in Learning and Teaching Microbial Genetics on Basic Genetics Concept, Skills and Attitude of Students in Applied Biology Program

อุไรวรรณ วิจารณกุล

สาขาวิชา ชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สถาบันราชภัฏ พิบูลสงคราม

2543

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

งานวิจัยนี้

ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาการเรียนการสอน

วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ในสถาบันราชภัฏ

ประจำปีงบประมาณ 2543

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ชื่อเรื่อง	ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ ทักษะ และทัศนคติ ของนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์
ผู้วิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. อุไรวรรณ วิจารณกุล
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์และชีววิทยา
ปีที่ทำการวิจัย	2543

บทคัดย่อ

การวิจัยเรื่องนี้เป็นการวิจัยในชั้นเรียนที่มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาความคิดรวบยอด ทักษะการปฏิบัติการ และทัศนคติที่มีต่อการเรียนพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ในเชิงปฏิบัติการ ได้ทำการสร้างบทปฏิบัติการวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์จำนวน 1o ปฏิบัติการ เนื้อหาของปฏิบัติการสอดคล้องกับหลักสูตรสภาสถาบันราชภัฏพุทธศักราช 2543 ประชากรที่ศึกษาเป็นนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีวประยุกต์ สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จำนวน 39 คน แบบแผนการวิจัยที่ใช้คือ Pretest-Posttest Design โดยใช้แบบวัดความคิดรวบยอด แบบสอบถามวัดทัศนคติ แบบสังเกตพฤติกรรมวัดทักษะการปฏิบัติการ การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window 98

ผลการวิจัยพบว่า นักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์มีความคิดรวบยอดในหลักการที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์สูง มีทัศนคติที่ดีในทางบวกต่อวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ และมีทักษะการปฏิบัติการทดลองสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับ $P < .01$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Research Title	**The Effect of Laboratory Approach in Learning and Teaching Microbial Genetics on Basic Genetics Concept, Skills and Attitude of Students in Applied Biology Program**
Author	**Assoc. Prof. Dr. Uriwan Vijaranakul**
Field	**Biology**
Research Year	**2000**

Abstract

This is the classroom research which the purpose of studying the concepts, laboratory skills and attitude toward laboratory approach in learning Microbial Genetics. Ten laboratory manuals in Microbial Genetics which correspond to the Rajabhat Institute Curriculum 2000 were constructed. Population in this study were students in Applied Biology Program of Rajabhat Institute Pibulsongkram. They are 39 students. Pretest-Posttest designed using questionares and laboratory behavior observation are the research tools of this study. The data were analyzed using SPSS for Window 98.

The study showed that students obtained higher concepts, positive attitudes and better laboratory skills on laboratory approach in learning Microbial Genetics at the level of statistically significant P < .01.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		iii
Abstract		iv
สารบัญ		v
สารบัญแผนภูมิ		vii
สารบัญตาราง		viii
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์	1
	1.3 โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์	2
	1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
	1.5 กรอบความคิดการวิจัย	2
	1.6 สมมติฐานการวิจัย	2
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	2.1 การสอนแบบปฏิบัติการ	3
	2.2 พันธุศาสตร์จุลินทรีย์	5
3	วิธีดำเนินการวิจัย	8
	3.1 แบบแผนการวิจัยและกลุ่มทดลอง	8
	3.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย	8
	3.3 การสร้างบทปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัย	8
	3.4 เครื่องมือและการรวบรวมข้อมูลในการดำเนินการทดลอง	9
	3.5 สถิติที่ใช้ในการวิจัย	9
4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล	11
5	สรุปผลและข้อเสนอแนะ	23
บรรณานุกรม		24
ภาคผนวก ก บทปฏิบัติการพันธุศาสตร์จุลินทรีย์		25
	ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	26
	ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	31

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

หน้า

ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย 35
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน 39
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย 44
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli* 48
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* 51
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิส 55
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน 58
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน 62
ภาคผนวก ข การคำนวณหาประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ 65
ภาคผนวก ค เครื่องมือวิจัย 88

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิ 1.1 กรอบความคิดในการวิจัย 2

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงแบบแผนการทดลอง	8
ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ที่เกิดขึ้นหลังจากการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการ	12
ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการศึกษาคู่มือปฏิบัติการ	13
ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการวางแผนการทดลอง	13
ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการจัดเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง	14
ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง	14
ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการบันทึกข้อมูลระหว่างการทดลอง	15
ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการแก้ปัญหาระหว่างการทดลอง	15
ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการสรุปผลการทดลอง	16
ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการจัดเก็บเครื่องมือและอุปกรณ์เมื่อเสร็จ	16
ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติในด้านความเข้าใจในวิธีการทดลอง	17
ตารางที่ 4.11 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติที่มีต่อความชัดเจนของบทปฏิบัติการ	17
ตารางที่ 4.12 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติในด้านความสนุกในการทำปฏิบัติการ	18
ตารางที่ 4.13 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติในการนำไปใช้ประโยชน์	18
ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติการบรรลุจุดประสงค์ของการทดลอง	19
ตารางที่ 4.15 ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่า t ของความคิดรวบยอดและทัศนคติก่อนและหลังปฏิบัติการ	20

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในการเรียนการสอนวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ที่กำหนดไว้ในหลักสูตรสถาบันราชภัฏให้มีการปฏิบัติการทดลองเพื่อเป็นการจัดโอกาสให้นักศึกษาได้ทำการทดลองด้วยตนเอง นับว่าเป็นวิธีการเรียนรู้ที่เรียก Laboratory approach ซึ่งเป็นวิธีการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์ที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งที่ทำให้ผู้เรียนเกิดการเรียนรู้ได้ครบสมบูรณ์ทุกด้าน ทั้งด้านความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ ทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ และทัศนคติ การเรียนการสอนโดยใช้การบรรยายเพียงอย่างเดียวโดยที่ผู้เรียนไม่ได้ปฏิบัติการทดลองจริง ถึงแม้จะทำให้ผู้เรียนเกิดการเรียนรู้ในด้านความคิดรวบยอดของเนื้อหาต่างๆ ได้นั้น แต่ผู้เรียนจะไม่สามารถเกิดการเรียนรู้ทักษะการปฏิบัติต่างๆ อันจะทำให้นักศึกษามีพัฒนาการของการเจริญงอกงามไม่ครบทุกด้าน และไม่เกิดความชำนาญในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งความชำนาญเหล่านี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการดำรงชีวิตในยุคโลกาภิวัฒน์ ในสภาพที่เป็นจริงในปัจจุบัน การจัดการเรียนการสอนวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ในสถาบันราชภัฏในเชิงปฏิบัติการ การทำการทดลองยังเป็นไปอย่างไม่ได้มาตรฐาน ไม่ทันกับความก้าวหน้าใหม่ๆ และไม่สามารถใช้การทดลองเพื่อให้ผู้เรียนเกิดความคิดรวบยอดในเรื่องต่างๆ ได้ ทั้งนี้เนื่องจากขาดบทปฏิบัติการการทดลองที่จะแสดงให้เห็นถึงความคิดรวบยอดในเรื่องนั้นๆ และไม่มีการวิจัยนำร่องในการหาตัวอย่างที่เหมาะสมที่จะแสดงให้เห็นถึงความคิดรวบยอดหนึ่งๆ ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยในเรื่อง "ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ ทักษะ และทัศนคติ ของนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์" เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการเรียนการสอนวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ในเชิงปฏิบัติการ

1.2 วิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ (Microbial Genetics)

หลักสูตรสถาบันราชภัฏ 2543 ได้กำหนดให้วิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ รหัส 4034401 เป็นวิชาบังคับเฉพาะแขนงวิชาจุลชีววิทยา ของนักศึกษาระดับปริญญาตรี โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ ซึ่งมีคำอธิบายรายวิชาดังนี้ สารพันธุกรรมของจุลินทรีย์ การแสดงออกของจีนและการควบคุม การกลายพันธุ์ (Mutation) การซ่อมแซม (Repair) การวิเคราะห์การเชื่อมโยง (Linkage analysis) รีคอมบิเนชัน (Recombination) พลาสมิด (Plasmids) ทรานสโปซอน (Transposon) เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม การหาตำแหน่งของจีน การทำแผนที่โครโมโซม (Chromosome mapping) คอนจูเกชัน (Conjugation) ทรานส์ฟอร์เมชัน (Transformation) ทรานส์ดักชัน (Transduction) (สำนักมาตรฐานการศึกษา สำนักงานสภาสถาบันราชภัฏ 2543)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

1.3 โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์

หลักสูตรสถาบันราชภัฏ ยึดหลักมาตรฐานวิชาการและวิชาชีพระดับอุดมศึกษา มุ่งผลิตกำลังคนที่สนองความต้องการของท้องถิ่นและสอดคล้องกับแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ทั้งที่เป็นนักวิชาการกึ่งวิชาชีพและวิชาชีพชั้นสูง มีความยืดหยุ่น สามารถปรับตามสภาพการเปลี่ยนแปลงด้านเศรษฐกิจ สังคม และความก้าวหน้าของวิทยาการ เปิดโอกาสให้มีการเลือกเรียนได้อย่างกว้างขวาง ทั้งหลักสูตรระดับปริญญาตรี ระดับอนุปริญญา และระดับปริญญาตรีหลังอนุปริญญา ในสาขาวิทยาศาสตร์ สายวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ ได้เปิด 16 โปรแกรมวิชา โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ เป็นโปรแกรมหนึ่งในสายที่กล่าวนี้

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสร้างบทปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์ที่สามารถแสดงความคิดรวบยอดในเรื่องนั้นๆ
2. เพื่อวิเคราะห์ผลการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการวิชาพันธุศาสตร์ต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ ทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ และทัศนคติของนักศึกษาในโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันราชภัฏ

1.5 กรอบความคิดในการวิจัย

การดำเนินการวิจัยได้ดำเนินการเป็นระยะต่างๆ ดังแผนภูมิ 1.1

วิเคราะห์เนื้อหาจากหลักสูตร → สร้างบทปฏิบัติการ → ทดลองบทปฏิบัติการกับกลุ่มทดลอง

↓

วิเคราะห์ข้อมูล ← เก็บรวบรวมข้อมูล ← นำไปสอนในชั้นเรียนเพื่อการวิจัย ← ปรับปรุงแก้ไขบทปฏิบัติการ

แผนภูมิ 1.1 กรอบความคิดในการวิจัย

1.6 สมมติฐานการวิจัย

การเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ สามารถสอนให้ผู้เรียนเกิดความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์สูงขึ้น และผู้เรียนมีทัศนคติทางบวกต่อการทำปฏิบัติการทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อเป็นพื้นฐานการวิจัยในรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 การสอนแบบปฏิบัติการ (Laboratory approach)

วิธีสอนแบบปฏิบัติการ เป็นวิธีการหนึ่งที่เปิดโอกาสให้ผู้เรียนได้มีส่วนร่วมในการปฏิบัติกิจกรรมการเรียนการทดลองด้วยตนเองมากที่สุด ครูเปลี่ยนบทบาทจากผู้บอกมาเป็นผู้จัดสถานการณ์ จัดสื่อการเรียนการสอนและให้คำแนะนำ จัดการเรียนการสอนโดยเน้นผู้เรียนเป็นศูนย์กลาง ผู้เรียนเป็นผู้กระทำการทดลอง เป็นผู้แก้ปัญหา เป็นผู้ค้นคว้าแลกเปลี่ยนประสบการณ์ซึ่งกันและกัน ช่วยเหลือกันทำงานมากขึ้น การสอนแบบปฏิบัติการเป็นการสอนที่เกิดจากแนวคิดที่ว่า การเรียนรู้เรื่องใดเรื่องหนึ่งนั้น ถ้าจะให้รู้จริงต้องลงมือปฏิบัติจริง ถ้าผู้เรียนเรียนโดยการทำจริง ปฏิบัติจริง ศึกษาและสรุปกฎเกณฑ์ด้วยตนเอง จะทำให้ผู้เรียนเข้าใจข้อสรุปเรื่องนั้น *mu*ารถถ่ายโยงความรู้นั้นไปใช้ในสถานการณ์อื่นได้ และสามารถได้ความคิดรวบยอดหรือหลักการที่สำคัญของเรื่องนั้นๆ เจอร์โรม บรูเนอร์ (Jerome Bruner) ให้แนวความคิดเกี่ยวกับการสอนให้เกิดการเรียนรู้ ต้องให้ผู้เรียนมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ การสอนแบบปฏิบัติการเป็นการจัดกิจกรรมให้ผู้เรียนทำการทดลองเรียนรู้หลักการ กฎเกณฑ์ ด้วยตนเอง

วธสอนแบบปฏิบัติการเป็นวิธีการสอนที่พัฒนามาจากความคิดและผลงานของนักการศึกษาในอดีตเช่น มอนเตสซอรี (Montessori) เกทเทกโน (Gattegno) เปสตาลอสซี (Pestalozzi) ดีนส์ (Dienes) และดิวอี้ย์ (Dewey) การเรียนรู้เกิดขึ้นจากการปฏิบัติจริง การสอนแบบปฏิบัติการได้ถูกนำไปใช้สอนในระดับประถมศึกษาในประเทศอังกฤษ โดยได้รับการสนับสนุนจากมูลนิธินัฟฟิลด์ (Nuffield Foundation) ซึ่งนำโดย อิดิธ บิกส์ (Edith Biggs) ในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดานั้น เคนเนธ คิดด์ (Kenneth Kidd) วิลเลียม ฟิทเจอรัล (William Fitzgerald) เดวิด คลากสัน (David Clarkson) เป็นผู้เผยแพร่วิธีการนี้ โดยมีความเชื่อมั่นว่า การสอนแบบปฏิบัติการจะเป็นวิธีการที่ดีที่จะฝึกให้นักเรียนมีความสามารถในการแก้ปัญหา (ลาวัลย์ พลกล้า 2523) การสอนแบบปฏิบัติการเริ่มใช้สอนในวิชาวิทยาศาสตร์ในการทดลองใช้สารเคมีเพื่อตรวจสอบวิเคราะห์ จนกลายมาเป็นวิธีสอนที่อาศัยการทดลองโดยใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

กาญจนา เกียรติประวัติ (2526) กล่าวว่า วิธีสอนแบบปฏิบัติการหมายถึงกระบวนการสอนที่ใช้ประสบการณ์ตรงเพื่อให้ได้ผลผลิต หรือข้อเท็จจริงจากการสังเกต และการทดลองเป็นรายบุคคลหรือเป็นกลุ่ม

ยุพิน พิพิธกุล (2524) การสอนแบบปฏิบัติการเป็นวิธีการสอนที่ให้นักเรียนกระทำด้วยตนเองเพื่อหาข้อสรุปจากการทดลองนั้น

ลาวัลย์ พลกล้า (2523) การสอนแบบปฏิบัติการเป็นวิธีการสอนที่ผู้เรียนได้เรียนจากการปฏิบัติการจริง เป็นการเรียนจากประสบการณ์ตรง นักเรียนได้ทดลองปฏิบัติ เสาะหาข้อมูล ค้นหาวิธีการและกระบวนการด้วยตนเอง การสอนแบบปฏิบัติการมีลักษณะสำคัญ ใช้วัสดุอุปกรณ์ที่เป็นรูปธรรม มีการจดบันทึกข้อมูล ทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ทั้งหมด นักเรียนเป็นผู้กระทำ ส่งเสริมปฏิสัมพัทธ์ นักเรียนเรียนตามความสามารถ ส่งเสริมความคิดสร้างสรรค์ การเรียนการสอนที่ยึดผู้เรียนเป็นศูนย์กลาง นักเรียนมีหน้าที่ในการปฏิบัติกิจกรรมที่ครูเสนอแนะไว้ อันนำไปสู่การค้นพบกฎ สูตร ข้อมูลด้วยตนเอง ครูเป็นผู้จัดสื่อการเรียนแนะนำและอำนวยความสะดวกให้

ลาวัลย์ พลกล้า (2523) ได้สรุปคุณค่าของการสอนแบบปฏิบัติการไว้ดังนี้

1. ช่วยให้นักเรียนเกิดข้อสรุปในเรื่องนั้นๆ เกิดจินตนาการและความคิดสร้างสรรค์ในการหากระบวนการและวิธีการต่างๆ
2. จากกิจกรรมที่ปฏิบัติจริง ทำให้เกิดข้อสรุปในเรื่องนั้นๆ เกิดความเข้าใจอย่างถ่องแท้ ทำให้เกิดความสามารถในการถ่ายโยงการเรียนรู้
3. ผู้เรียนเป็นศูนย์กลาง ผู้เรียนทำกิจกรรมตลอดเวลา
4. การเรียนแบบปฏิบัติการทำให้ผู้เรียนไม่เคร่งเครียด ทำให้ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อวิชา
5. เปิดโอกาส ในการนำปัญหาต่างๆ มาให้นักเรียนคิด เร้าให้เกิดความกระตือรือร้นในการแก้ปัญหา

ยุพิน พิพิธกุล *(2523)* ได้เสนอข้อดีของวิธีการสอนแบบปฏิบัติการไว้ดังนี้

1. นักเรียนสนใจเพราะได้ทำสิ่งต่างๆ ด้วยตนเอง
2. การเรียนแบบรูปธรรมไปสู่นามธรรม และการเรียนโดยการกระทำ
3. ผู้เรียนเข้าใจเนื้อหาวิชาได้ชัดเจนขึ้นและสามารถค้นพบความจริงด้วยตนเอง
4. ผู้เรียนมีอิสระในการทำงาน และมีพัฒนาการเป็นรายบุคคล ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในตนเอง
5. ผู้เรียนประสานงานกันและแลกเปลี่ยนความคิดกันเมื่อทดลองเป็นกลุ่ม
6. เมื่อผู้เรียนทดลองแล้วประสบผลสำเร็จทำให้มีกำลังใจในการเรียน
7. ผู้เรียนจะใช้มือได้คล่องแคล่วขึ้นเพราะจะต้องจับเครื่องมือหรือวัสดุ
8. ผู้เรียนเข้าใจเนื้อหาวิชาบางเรื่องได้ดีที่สุดจากการเรียนปฏิบัติการ

ในการวางแผนการสอนแบบปฏิบัติการ เริ่มต้นด้วยการเลือกเนื้อหาที่จะสอน กำหนดความสามารถที่ต้องการฝึก กำหนดสื่อการเรียนการสอน การจัดการ การรายงานผล และการประเมินผล วิธีการสอนแบบปฏิบัติการต้องอาศัยสื่อการเรียนการสอนเป็นหลัก ได้แก่ บทเรียนปฏิบัติการ (Laboratory lesson) เป็นสื่อการเรียนที่ให้ผู้เรียนได้เรียนตามวิธีการทางวิทยาศาสตร์ นักเรียนต้องทำตามข้อปฏิบัติ (Laboratory direction) แล้วสรุปหาข้อเท็จจริง สูตร กฎเกณฑ์ต่างๆ จากข้อมูลต่างๆ เหล่านั้นด้วยตนเอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

2.2 พันธุศาสตร์จุลินทรีย์ (Microbial Genetics)

พันธุศาสตร์จุลินทรีย์พัฒนาขึ้นไปตามความเข้าใจในหลักการพื้นฐานทางพันธุศาสตร์ และพัฒนาขึ้นตามข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของพันธุกรรมระดับโมเลกุล การค้นพบเจเนติก รีคอมบิเนชัน (Genetic recombination) ในแบคทีเรีย ตามด้วยการแปลง (Transformation) การถ่ายโอนจีน (Transduction) การผสมพันธุ์แบบสังยุค (Conjugation) เป็นเหตุการณ์ที่เพิ่งเกิดขึ้นเมื่อเร็วๆ นี้ การค้นพบเกี่ยวกับการแปลงเป็นหลักฐานโดยตรงที่แสดงว่าดีเอ็นเอคือสารพันธุกรรม จุดเริ่มต้นอยู่ที่งานของเฟรเดอริค กริฟฟิท (Frederic Griffith) ใน ค.ศ. 1928 เรื่องการแปลงโดยค้นพบ ตัวการที่สำคัญของการแปลง (Transforming principle) โดยทำการทดลองโดยใช้แบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* ซึ่งทำให้เกิดโรคปอดบวมในหนู แบคทีเรียนี้มี 2 ชนิด คือชนิดผิวเรียบและชนิดผิวขรุขระ เนื่องจากความแตกต่างของผนังเซลล์ แบคทีเรียสายพันธุ์ผิวเรียบเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงและทำให้หนูตาย ขณะที่สายพันธุ์ขรุขระไม่ทำให้หนูตาย จากการที่ใช้ความร้อนฆ่าเซลล์ผิวเรียบ และเมื่อผสมกับเซลล์อื่น มันสามารถเปลี่ยนหรือแปลงเซลล์อื่น กริฟฟิทได้ค้นพบการแปลง ออสวอลด์ อเวอรี (Oswald Avery) โคลิน แมคคลาวด์ (Colin MacCloud) และแมคคลิน แมคคาร์ที (Maclyn McCarty) ได้พิสูจน์ว่าตัวการที่ทำให้เกิดการแปลง (Transforming element) ของกริฟฟิทคือดีเอ็นเอ โดยทำการแยกเศษเซลล์ของเซลล์ผิวเรียบที่ตายและทดสอบแต่ละส่วนถึงความสามารถในการแปลง เฉพาะส่วนที่เป็นดีเอ็นเอเท่านั้นที่ทำการแปลงเซลล์อื่น

การทดลองของเฮอรเชส์และเชส (Hershey-Chase) พิสูจน์ข้อค้นพบของอเวอรี โดยใช้ เฟจ T2 (T2 phage) โดยทำเครื่องหมาย ^{35}S ที่โปรตีน และ ^{32}P ที่ดีเอ็นเอ และทำให้เกิดการติดเชื้อใน *E. coli* หลังจากการติดเชื้อพบ ^{35}S ในเปลือกที่ว่างเปล่า และพบ ^{32}P ในเซลล์ของ *E. coli* และในเฟจลูกหลาน ดังนั้นจึงพิสูจน์ได้ว่า ดีเอ็นเอคือสารพันธุกรรม

พันธุศาสตร์จุลินทรีย์ มีประวัติความก้าวหน้าดังนี้

ในปี ค.ศ. 1946 โจชัว ลีเดอร์เบิร์ก (Joshua Lederberg) และเอดเวิร์ด ทาทัม (Edward Tatum) แสดงให้เห็นถึง รีคอมบิเนชัน (Recombination) ในแบคทีเรีย และค้นพบการถ่ายทอดจีนโดยการคอนจูเกชัน

ในปี ค.ศ. 1952 วิลเลียม เฮย์ (William Hayes) พิสูจน์ว่ามี F แฟกเตอร์ ซึ่งแสดงถึงภาวะเจริญพันธุ์ (Fertility) ในการผสมพันธุ์แบบสังยุค (Conjugational crosses)

ลูกา คาวาลลิ (Luca Cavalli) และ เฮย์ (Hayes) ได้ค้นพบ สายพันธุ์ Hfr ซึ่ง F แฟกเตอร์ ผสมผสานเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย

จาคอบ (Jacob) พิสูจน์ว่าโครโมโซมของแบคทีเรียเป็นวง

ปลายศตวรรษ 1940 และต้นศตวรรษ 1950 แอนดรี/ ลอฟฟ์ (Andre/ Lwoff) ได้ค้นพบธรรมชาติของไลโซจีนี (Lysogeny) ใน *Bacillus megaterium*

ในปี ค.ศ. 1952 โจชัว ลีเดอร์เบิร์ก(Joshua Lederberg) และ นอร์ตัน ซินเดอร์ (Norton Zinder) ค้นพบการถ่ายโอนจีน (Transduction) ของ *Salmonella typhimurium* โดย เฟจ (Phage) P22

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ต้นปี ค.ศ. 1950 เฮอร์เชย์ (Hershey) และผู้ร่วมงานได้ศึกษารายละเอียดถึงการผสมทางพันธุกรรมโดยเฟจ T เลขคู่ (T-even) ใน *E. coli*

ซีมอย เบนเซอร์ (Seymour Benzer) ศึกษาระบบ r II โดยใช้เฟจ T4 พิสูจน์ว่าจีนประกอบด้วยตำแหน่งของการกลายเรียงเป็นแนวยาวซึ่งสามารถแยกออกจากกันโดยการรีคอมบิเนชัน (Recombination) เขาให้ความหมายจีน (Gene) ในเชิงหน้าที่โดยใช้ ซิส-ทรานส์ เทสต์ (Cis-Trans Test) ว่าซิสทรอน (Cistron) ซึ่งมีความหมายเท่ากับจีน การศึกษาของเบนเซอร์เป็นสะพานเชื่อมระหว่าง คลาสิคอลเจเนติกและความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างของดีเอ็นเอซึ่งค้นพบโดยเจมส์ วอตสัน (James Watson) และฟรานซิส คริก (Francis Crick) ในคลาสิคอลเจเนติก จีนบนโครโมโซมคล้ายกับลูกปัดบนสร้อยคอไม่สามารถแบ่งแยกได้และประกอบด้วยหน่วยที่เล็กที่สุดของการกลายและรีคอมบิเนชัน จากโครงสร้างของดีเอ็นเอแสดงว่า จีนประกอบด้วยลำดับคู่นิวคลีโอไทด์เบสมีหน่วยย่อยๆ ภายในจีนที่สัมพันธ์กับคู่นิวคลีโอไทด์แต่ละคู่ ซึ่งสามารถกลายและรีคอมไบน์ซึ่งกันและกัน

ซิดนีย์ เบรนเนอร์ (Sydney Brenner) วิเคราะห์พันธุกรรมของระบบ rII ของเฟจ T4 และแสดงให้เห็นว่าธรรมชาติของรหัสพันธุกรรมมีลักษณะเป็น 3

ปี ค.ศ. 1961 จาคอบ โมโนด (Jacob Monad) ได้ค้นพบธรรมชาติการควบคุมของจีนใน *lac* operon ของ *E. coli* มีปัจจัยที่ควบคุมจีน รีเพรสเซอร์ (Repressors) ควบคุมทางลบ แอคติเวเตอร์ (Activator) ควบคุมทางบวก

ปี ค.ศ. 1966 วอลเตอร์ กิลเบิร์ต (Walter Gilbert) และมัลเลอร์ ฮิลล์ (Muller-Hill) ได้แยกรีเพรสเซอร์ตัวแรกออกมา ตั้งแต่นั้นมาจึงได้มีการค้นพบ กลไกการควบคุมอื่นๆ

ต้นปี ค.ศ. 1960 เบคฉวิท (Beckwith) และไซเนอร์ (Signer) ทำการทดลองการหลอมรวม (Fusion) ของจีนต่างๆ และโอเปอรอน กลางปี ค.ศ. 1960 เบคฉวิทและไซเนอร์ เป็นผู้ที่ทำให้เกิดจุดเริ่มต้นของเทคนิคพันธุวิศวกรรมในหลอดทดลอง ใช้เทคนิคของพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ในการดำเนินการเกี่ยวกับจีน เป็นผู้นำในการทดลองการโคลนนิ่ง (Cloning) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเทคนิค เทคนิคจีนและโอเปอรอนฟิวชันเป็นกลยุทธสำคัญในการศึกษาการควบคุมของจีน จีนจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ถูกหลอมรวมเข้ากับจีนแลกซี (*lacZ* gene) ซึ่ง เป็นรหัส (encode) เบตากาแลกโตไซเดส มีรีพอร์เตอร์ จีน (Reporter gene) หลายชนิดที่ใช้ในการทดลองเรื่อง การหลอมรวมจีน (Gene fusion)

ปี ค.ศ. 1970 พอล เบิร์ก (Paul Bergs) สแตนเลย์ โคเฮน (Stanley Cohen) เฮอร์เบิร์ก บอยเออร์ (Herberg Boyer) ใช้วิธีการทางชีวเคมี ในการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าไปในเวคเตอร์ต่างๆ ชิมาดา (Shimada) วิสเบิร์ก (Weisberg) ก็อตเตสแมน (Gottesman) ได้คิดค้นเทคนิคในการตรวจหา เฟจในโครโมโซม

การใช้ ทรานสโพซิเบิล เจเนติก อีลีเมนต์ (Transposable genetic elements) เป็นสิ่งช่วยอำนวยความสะดวกอย่างดียิ่งของจีน ซึ่ง บาร์บารา แมกคลินทอก (Barbara Mc Clintock) ได้บรรยาย ทรานสโพซิเบิล อีลีเมนต์ (Transposable elements) ใน ข้าวโพด

Pibulsongkram Rajabhat University

กลางและปลายปี ค.ศ. 1970 เคลกเนอร์ โบสไตน์ (Klecner Bostein) และ โคเฮน เบิร์ก(Cohen Berg) ได้คิดค้นเทคนิคการใช้ ทรานส์โพซอนที่เป็นรหัสสำหรับการต้านทานสารปฏิชีวนะ (Transposon encoding antibiotic resistance)

ในปี ค. ศ. 1943 ซาลวาดอร์ ลอเรีย (Salvador Luria) แมกซ์ เดลบรูก (Max Delbruck) ได้ศึกษากระบวนการกลาย (Mutagenesis) เขาได้มองหาสายพันธุ์กลายที่มีความต้านทานต่อเฟจ T1 ในประชากรของแบคทีเรีย สามารถสาธิตให้เห็นว่ามีการกลายเกิดขึ้นอย่างบังเอิญเป็นไปอย่างสุ่ม และในปี ค.ศ. 1952 โจชัว ลีเดอร์เบิร์ก (Joshua Lederberg) ใช้เทคนิค เรพลิกา เพลตติง (Replica plating) พิสูจน์ข้อคิดนี้

บรูค เอมิส (Bruce Ames) คิดค้นชุดสายพันธุ์ทดสอบซึ่งสามารถตรวจสอบการก่อการกลาย (Mutagenicity) ของสารก่อการกลาย (Mutagen) ที่มีเปอร์เซ็นต์สูง แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างสารก่อการกลาย และมะเร็ง

กลางปี ค.ศ. 1970 วิทคิน แรดแมน (Witkin Radman) แสดงให้เห็นการมีระบบ SOS ของ *E. coli* ซึ่งสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการกลาย

ลาร์รี เทลเลอร์ (Larry Taylor) บรูค โล (Brooks Low) บาร์บารา แบคแมน (Barbara Bachmann) เป็นผู้สร้างแผนที่โครโมโซม ในช่วง 20 ปี การทำแผนที่ โครโมโซมทำได้โดยการใช้ การผสมของ Hfr และ P_1 Cotransduction การทำแผนที่ของ *E. coli* ในปี ค.ศ. 1963 ในแผนที่ มี จีน 100 จีน ในปี ค.ศ. 1990 มี จีน 1400 จีน

พันธุศาสตร์ของแบคทีเรียในทุกวันนี้ พัฒนาขึ้นอย่างดีและรวดเร็วมาก การรวมเอาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์และเทคนิครีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ เป็นเครื่องมืออย่างดีสำหรับนักชีววิทยาระดับโมเลกุล สามารถโคลนดีเอ็นเอจากแหล่งต่างๆ ทำให้จีนแสดงออกทำการเปลี่ยนแปลงและวิเคราะห์ดีเอ็นเอในแบคทีเรีย สร้างการกลายได้อย่างง่ายโดยกระบวนการก่อการกลายในเซลล์และในหลอดทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แบบแผนการวิจัยและกลุ่มทดลอง

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงปฏิบัติการ ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลองตามแบบแผนการทดลองแบบ One Group Pretest-Posttest Design ดังแสดงในตารางแบบแผนการทดลอง

ตารางที่ 3.1 แสดงแบบแผนการทดลอง

ก่อนปฏิบัติการ	ทดลอง	หลังปฏิบัติการ
Treatment (T_1)	X	T_2

สัญลักษณ์ที่ใช้ในแบบแผนการวิจัย

T_1 แทนการวัดความคิดรวบยอด ทัศนคติก่อนเรียนปฏิบัติการ

T_2 แทนการวัดความคิดรวบยอด ทัศนคติหลังเรียนปฏิบัติการ

X แทนการสอนโดยการใช้การเรียนแบบปฏิบัติการ

กลุ่มทดลองได้แก่นักศึกษาในโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สถาบันราชภัฏพิบูลสงครามพิษณุโลกที่เรียนวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ ในภาคเรียนที่ 2 ปีการศึกษา 2543 จำนวน 39 คน

3.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย

ดำเนินการวางแผนการทดลอง สร้างบทปฏิบัติการ สร้างเครื่องมือวัดทัศนคติ ทักษะ และความคิดรวบยอด ดำเนินการทดลองใช้เครื่องมือกับกลุ่มทดลอง และปรับแก้ไขเครื่องมือในภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2543 ทำการทดลองในภาคเรียนที่ 2 ปีการศึกษา 2543 ใช้เวลาในการทดลอง 10 สัปดาห์ สัปดาห์ละ 4 คาบ คาบละ 50 นาที รวม 40 คาบ ทดลองและวิเคราะห์ผลในภาคเรียนที่ 2 ปีการศึกษา 2543

3.3 การสร้างบทปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัย

ศึกษาเอกสารและตำราพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ และเอกสารเกี่ยวกับการสร้างแบบสอบถาม และแบบประเมินผล วิเคราะห์เนื้อหา และจุดประสงค์ในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ กำหนดโครงสร้างของเนื้อหาที่ใช้ในการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ทดลองนี้จาก คำอธิบายรายวิชา พันธุศาสตร์จุลินทรีย์ หลักสูตรสภาสถาบันราชภัฏ 2543 โดยแบ่งเนื้อหาออกเป็น 10 บทปฏิบัติการดังนี้

1. การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (Isolation of single colony)
2. เรพลิกา เพลตติง (Replica plating)
3. การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย (Maintaining Bacterial Strains)
4. การไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization)
5. การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (Mutation and Selection of Mutation)
6. การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E.coli* (Total DNA Isolation of *E. coli*)
7. การสกัดพลาสมิดจาก *E.coli* (Plasmid Isolation of *E. coli*)
8. อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ (DNA Electrophoresis)
9. การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน (Transformation)
10. การคอนจูเกชัน (Conjugation)

ดำเนินการสร้างบทปฏิบัติการ แบบสอบถาม และแบบวัดพฤติกรรม นำบทปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัยที่สร้างขึ้นไปทดลองใช้กับนักศึกษากลุ่มทดลองจำนวน 30 คน หาค่าความเชื่อมั่นหรือความเที่ยง (Reliability) ของเครื่องมือวิจัย และทำการปรับปรุงบทปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัย และนำมาใช้ในการดำเนินการทดลอง

3.4 เครื่องมือและการรวบรวมข้อมูลในการดำเนินการทดลอง

การจัดกิจกรรมและการรวบรวมข้อมูลเป็นดังนี้

3.4.1 ก่อนปฏิบัติการแต่ละปฏิบัติการให้ผู้เรียนทำแบบวัดความคิดรวบยอดและทัศนคติ

3.4.2 ให้ผู้เรียนดำเนินการทดลองตามปฏิบัติการแต่ละเรื่อง และวัดทักษะการปฏิบัติการจากแบบสังเกตพฤติกรรมในแต่ละปฏิบัติการ

3.4.3 เมื่อสิ้นสุดการดำเนินการทดลองแต่ละเรื่อง ให้ผู้เรียนทำแบบวัดความคิดรวบยอดและทัศนคติหลังเรียน

3.5 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

3.5.1 สถิติพื้นฐาน ใช้โปรแกรม SPSS/PC+ ในการวิเคราะห์ หาค่าสถิติพื้นฐาน ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ค่าความเชื่อมั่นหรือความเที่ยง (Reliability) ของเครื่องมือวิจัย

3.5.2 เกณฑ์การแปรผลมัชฌิมเลขคณิตจากการตอบแบบวัดความคิดรวบยอด ทัศนคติ และทักษะการปฏิบัติการ ใช้เกณฑ์ดังนี้

1.0-1.49 = ระดับต่ำหรือไม่มี	1.5-2.49 = ระดับต่ำ	2.5-3.49 = ระดับปานกลาง
3.5-4.49 = ระดับดี	4.5-5.0 = ระดับดีมาก	

3.5.3 ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ จากสูตร E_1/E_2

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

$$E_1 = \frac{\sum X/N}{A} \times 100$$

เมื่อ E_1 = ประสิทธิภาพของกระบวนการ

X = คะแนนรวมของทักษะการปฏิบัติการในระหว่างการทดลอง (กระบวนการ)

A = คะแนนเต็มของทักษะการปฏิบัติการในระหว่างการทดลอง (กระบวนการ)

N = จำนวนนักศึกษา

$$E_2 = \frac{\sum F/N}{B} \times 100$$

เมื่อ E_2 = ประสิทธิภาพของผลลัพธ์

F = คะแนนรวมของความคิดรวบยอดและ ทัศนคติ หลังการปฏิบัติการ (ผลลัพธ์)

B = คะแนนเต็มของความคิดรวบยอดและ ทัศนคติ หลังการปฏิบัติการ (ผลลัพธ์)

N = จำนวนนักศึกษา

(นภาพร สิงหทัต 2533)

3.5.4 ความก้าวหน้าในการปฏิบัติการ

$$\text{ร้อยละของความก้าวหน้า} = \frac{\text{คะแนนเฉลี่ยหลังการปฏิบัติ} - \text{คะแนนเฉลี่ยก่อนการปฏิบัติ}}{\text{คะแนนเต็ม}} \times 100$$

(ดนัย เทียนพุฒ 2525)

3.5.5 การทดสอบความแตกต่างระหว่างก่อนปฏิบัติการและหลังปฏิบัติการด้วยค่าที (t-test)

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N\sum D^2 - (\sum D)^2}{N-1}}}$$

$\sum D$ = ผลรวมของความแตกต่างระหว่างคะแนนก่อนปฏิบัติการและหลังปฏิบัติการแต่ละคู่

$\sum D^2$ = ผลรวมของความแตกต่างระหว่างคะแนนก่อนปฏิบัติการและหลังปฏิบัติการแต่ละคู่ที่ยกกำลังสอง

N = จำนวนนักศึกษา

(ชูศรี วงศ์รัตนะ 2530)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การจัดกิจกรรมการเรียนวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์โดยวิธีปฏิบัติการ ของนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม ผลการวิจัยได้สร้างบทปฏิบัติการ 10 บทปฏิบัติการดังในภาคผนวก ก. บทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นถูกนำไปใช้ในการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการเพื่อศึกษาผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ ทักษะ และทัศนคติของนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์จำนวน 39 คน ผู้วิจัยจึงนำเสนอข้อค้นพบและผลการวิจัยเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 ผลการเรียนการสอน**เชิงปฏิบัติการต่อความคิดรวบยอด ทักษะและทัศนคติ ของนักศึกษาซึ่งแบ่งออกเป็น**

ส่วนที่ 1.1 ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

ส่วนที่ 1.2 ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการต่อทักษะการปฏิบัติที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

ส่วนที่ 1.3 ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการต่อทัศนะคติของนักศึกษาในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

ส่วนที่ 2 การทดสอบสมมติฐาน และส่วนที่ 3 ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ ได้มีการหาค่าความเชื่อมั่นหรือความเที่ยงของเครื่องมือได้ผลว่า ค่า r = 0.6452 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูง

ส่วนที่ 1.1 ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

ความคิดรวบยอดที่เกิดขึ้นโดยรวมที่ได้หลังจากการปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ปานกลางถึงดี และในแต่ละปฏิบัติการทั้ง 10 ปฏิบัติการได้ผลดังตารางที่ 4.1

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ที่เกิดขึ้นหลังจากการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการ

ความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์	Mean	SD	ความคิดรวบยอดอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	4.1795	.9966	ดี
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติ้ง	3.7949	.7320	ดี
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.1795	.5064	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.7436	.6774	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.2564	.9925	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.4872	.6437	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.7692	.4868	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	3.1026	.6405	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.1795	.6437	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.7949	.6147	ดี

ส่วนที่ 1.2 ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

ทักษะการปฏิบัติของนักศึกษาหลังจากการปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ปานกลางถึงดี คือทำได้ครบถ้วนสมบูรณ์ แต่ยังไม่ชำนาญหรือคล่อง จนกระทั่งถึงทำได้ชำนาญแต่ยังแนะนำคนอื่นไม่ได้ ในแต่ละปฏิบัติการทั้ง 10 ปฏิบัติการ นักศึกษามีทักษะในการปฏิบัติในรายละเอียดดังตารางที่ 4.2-4.9

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการศึกษาคู่มือปฏิบัติการ

ทักษะการศึกษาคู่มือปฏิบัติการ	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.4103	1.0935	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.2821	1.0748	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.4103	.9657	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.2564	.8497	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.4872	1.0481	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.4872	.8545	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.3333	.9551	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	3.1282	.9228	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.0513	.9445	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.2821	.9445	ปานกลาง

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการวางแผนการทดลอง

ทักษะการวางแผนการทดลอง	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.2564	.9657	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.0769	.8701	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.3077	.6941	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.2564	.8497	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.5897	.9095	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.4615	.7896	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.5897	.7152	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	2.9744	.8732	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	2.9744	.8732	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.2051	.8329	ปานกลาง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการจัดเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

ทักษะการเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.5385	1.0475	ดี
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.3333	.9823	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.4103	.8497	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.4651	.8223	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.7179	.9986	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.7436	.9380	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.7692	.9587	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	3.1795	1.0227	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.1795	.9966	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.2051	.9228	ปานกลาง

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

ทักษะการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.4103	1.0187	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.5897	1.1173	ดี
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.6410	1.0634	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.6154	1.0910	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.9744	.8425	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.5897	.8497	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.6154	.8148	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	3.1284	1.0047	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.4359	.8521	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.3846	.9898	ปานกลาง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะในการบันทึกข้อมูลระหว่างการทดลอง

ทักษะการบันทึกข้อมูลระหว่างการทดลอง	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.4359	.9946	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.3846	.8465	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.6667	1.0087	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟีไลเซชัน	3.6667	.8377	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.6667	.8686	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.8205	.7905	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.6923	.7662	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ	3.3846	.8771	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.3846	.9066	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน			

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะการแก้ปัญหาระหว่างการทดลอง

ทักษะการแก้ปัญหาระหว่างการทดลอง	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.1795	1.0729	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.1538	.9043	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.4872	.9423	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟีไลเซชัน	3.6410	.9315	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.5641	.8521	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.6667	.9551	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.7179	.8255	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ	3.3077	.7998	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.0256	1.0384	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.1026	1.0953	ปานกลาง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะการสรุปผลการทดลอง

ทักษะการสรุปผลการทดลอง	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.5664	.9905	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.4615	1.1435	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.5897	.8801	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟีไลเซชัน	3.8974	.7538	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.8974	..7180	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.6923	.7310	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.8462	.8747	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	3.5128	.8231	ดี
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.4103	.9095	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.3846	1.0666	ปานกลาง

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทักษะการจัดเก็บเครื่องมือและอุปกรณ์เมื่อเสร็จ

ทักษะการจัดเก็บเครื่องมือ	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.6923	1.3009	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.8462	1.0141	ดี
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.8974	1.0207	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟีไลเซชัน	3.8205	.9966	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	4.1282	.7671	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.8205	.7564	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	4.0513	.8568	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	3.4692	.8587	ดี
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.8205	.9423	ดี
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.7436	.9567	ดี

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ส่วนที่ 1.3 ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการต่อทัศนะคติของนักศึกษาในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

หลังจากการเรียนโดยการปฏิบัติการนักศึกษามีเจตคติที่ดีและมีทัศนคติในทางบวกต่อการเรียนแบบปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 4.10-4.14

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติในด้านความเข้าใจวิธีการทดลองในบทปฏิบัติการ

ทัศนคติในด้านความเข้าใจวิธีการทดลอง	Mean	SD	ทัศนคติ
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.9744	.8425	ดี
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	4.1538	.6299	ดี
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.8462	.8124	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.8205	.7564	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.8205	.7564	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.5385	.8223	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.6923	.7310	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ	3.4872	.7208	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.3590	.8732	ดี
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.5641	.7879	ดี

ตารางที่ 4.11 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติที่มีต่อความชัดเจนของบทปฏิบัติการ

ทักษะการจัดเก็บเครื่องมือ	Mean	SD	ความชัดเจน
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	4.0000	.8885	ดี
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	4.1282	.6147	ดี
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.8462	.8121	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.7179	.8255	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.8205	.7905	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.7436	.7853	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.9487	.6468	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ	3.7436	.8181	ดี
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.4103	.9095	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.6923	.7662	ดี

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4.12 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติในด้านความสนุกในการทำปฏิบัติการ

ทักษะการจัดเก็บเครื่องมือ	Mean	SD	ทักษะอยู่ในเกณฑ์
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.8718	.8329	ดี
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	4.0769	.9286	ดี
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.7179	.7591	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.8462	.9608	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.7949	..8006	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.5897	.7511	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.5897	.7853	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ	3.5641	.9118	ดี
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.4872	1.0227	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.4872	.9699	ปานกลาง

ตารางที่ 4.13 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติในการนำไปใช้ประโยชน์

ทัศนคติในการนำไปใช้ประโยชน์	Mean	SD	ทัศนคติ
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	4.3590	.6684	ดี
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	4.1538	.8747	ดี
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	4.1795	.8545	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	4.000	.8584	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	4.000	.8885	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.7179	.9162	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.8205	.9140	A
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ	3.9231	.8701	ดี
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.4615	1.2533	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.7949	.8938	ดี

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทัศนคติการบรรลุจุดประสงค์ของการทดลอง

ทัศนคติการบรรลุจุดประสงค์ของการทดลอง	Mean	SD	ทัศนคติ
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	3.6154	.7114	ดี
ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง	3.7436	.9380	ดี
ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	3.7179	.6863	ดี
ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน	3.6667	.7375	ดี
ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	3.6923	.7662	ดี
ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	3.5128	.6014	ดี
ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	3.7949	.6951	ดี
ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	3.5641	.8206	ดี
ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	3.3590	1.0384	ปานกลาง
ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน	3.5641	.7879	ดี

ส่วนที่ 2 ผลการทดสอบสมมติฐาน

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อทดสอบสมมติฐานที่ตั้งไว้ดังนี้

การเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ทำให้ผู้เรียนได้ความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์สูงขึ้นและมีทัศนคติทางบวกต่อการทำปฏิบัติการทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

การเสนอผลการวิเคราะห์ข้อมูลและแปลความหมายเพื่อความเข้าใจที่ตรงกันจึงเสนอสัญลักษณ์ในการวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

N = จำนวนนักศึกษากลุ่มทดลอง

$\bar{X}$ = คะแนนเฉลี่ย

SD = ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

t = ค่าสถิติ

ในการทดสอบสมมติฐานใช้สถิติพื้นฐานค่าเฉลี่ย ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้สถิติ t-test

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล การเปรียบเทียบความคิดรวบยอดและทัศนคติก่อนทำปฏิบัติการและหลังปฏิบัติการของนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีวประยุกต์ดังตารางที่ 4.15 จากตารางแสดงว่า ความคิดรวบยอดและทัศนคติของนักศึกษาหลังการปฏิบัติการทดลองสูงกว่าก่อนปฏิบัติการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งระดับ .05 และระดับ .01

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4.15 ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า t ของความคิดรวบยอดและทัศนคติก่อนและหลังปฏิบัติการ

ปฏิบัติการ	การปฏิบัติ	N	$\overline{X}$	S.D.	t
1. การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	ก่อน	39	8.4615	1.4253	8.886
	หลัง	39	11.6154	1.6995	
2. เรพลิกาเพลตติง	ก่อน	39	7.7821	1.4086	11.984
	หลัง	39	11.6974	1.6761	
3. การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย	ก่อน	39	7.4487	1.1401	12.363
	หลัง	39	11.0487	1.6651	
4. การไลโอฟิไลเซชัน	ก่อน	39	7.5256	1.1059	11.167
	หลัง	39	11.0359	1.6423	
5. การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	ก่อน	39	7.6282	1.1738	11.416
	หลัง	39	10.9231	1.4803	
6. การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*	ก่อน	39	7.5256	1.6581	8.898
	หลัง	39	10.7000	1.5721	
7. การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*	ก่อน	39	7.3590	1.2137	13.342
	หลัง	39	11.1154	1.3374	
8. อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ	ก่อน	39	7.1923	1.0979	13.935
	หลัง	39	10.4821	1.6023	
9. การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน	ก่อน	39	7.2949	1.4900	7.025
	หลัง	39	9.8872	2.1439	
10. การคอนจูเกชัน	ก่อน	39	7.3462	1.0585	10.837
	หลัง	39	10.7077	1.5729	
11. รวมทุกปฏิบัติการ	ก่อน	39	75.5641	7.9456	17.374
	หลัง	39	107.6974	10.9738	

$t_{(.05, 38)} = 2.336$

$t_{(.01, 38)} = 2.962$

จากตาราง 4.15 แสดงว่าหลังการเรียนโดยการปฏิบัติการ นักศึกษามีความคิดรวบยอดสูงกว่าและมีทัศนคติในทางบวกต่อวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ส่วนที่ 3 ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ

ค่าประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ได้ถูกคำนวณโดยการหาประสิทธิภาพของกระบวนการ (E_1) และหาค่าประสิทธิภาพของผลลัพธ์ (E_2) และแปลความโดยเทียบกับเกณฑ์ $E_1:E_2 = 75 : 75$ โดยมีค่าเบี่ยงเบนได้ $\pm 5\%$ ปรากฏผลการทดลองดังในภาคผนวก ก ซึ่งแสดงประสิทธิภาพของการปฏิบัติการและความก้าวหน้าในการปฏิบัติการ และสามารถสรุปผลการทดลองดังนี้

ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ ค่า $E_1:E_2 = 68 : 92.8$

ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกาเพลตติง ค่า $E_1:E_2 = 67.9 : 78$

ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย ค่า $E_1:E_2 = 71.07 : 73.67$

ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชันค่า $E_1:E_2 = 72 : 73.60$

ปฏิบัติการที่ 5 การกลายและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย ค่า $E_1:E_2 = 75.13 : 72.80$

ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli* ค่า $E_1:E_2 = 73.18 : 71.33$

ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* ค่า $E_1:E_2 = 74.27 : 75.8$

ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอ ค่า $E_1:E_2 = 66.07 : 69.87$

ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชันค่า $E_1:E_2 = 65.2 : 65.9$

ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน ค่า $E_1:E_2 = 66.67 : 71.27$

รวมทุกปฏิบัติการ ค่า $E_1:E_2 = 70.97 : 71.73$

อภิปรายผลการทดลอง

หลังจากการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ นักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์มีความคิดรวบยอดในเรื่องที่สำคัญทางพันธุศาสตร์สูง เพราะได้ลงมือปฏิบัติจริงและค้นพบหลักการที่สำคัญของเรื่องต่างๆ ได้ด้วยตนเองและสามารถเขียนบรรยายหลักการออกมาเป็นข้อสรุปของตนเองได้ ในด้านทักษะการปฏิบัตินั้นมีทักษะที่สูงขึ้นชัดเจนเพราะทักษะหรือความชำนาญจะเกิดขึ้นไม่ได้เลยถ้าเพียงแต่ใช้การอ่านอย่างเดียว การได้ลงมือทำการทดลองด้วยตนเอง และเมื่อประสบปัญหา สามารถคิดหาวิธีแก้ปัญหา และลงมือแก้ปัญหาจนสามารถบรรลุจุดประสงค์ของการทดลองแต่ละเรื่อง ทำให้นักศึกษายิ่งเกิดความชำนาญ และสามารถนำเทคนิคที่ตนค้นพบไปใช้แก้ปัญหาในสถานการณ์อื่นๆ ได้ ในด้านทัศนะคติของนักศึกษาต่อการปฏิบัติ นักศึกษาเคยมีทัศนคติก่อนที่จะเรียนวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ว่าเป็นวิชาที่ยาก เพราะเรื่องราวทางด้านพันธุศาสตร์จุลินทรีย์เป็นเรื่องเกี่ยวกับจีน (Gene) การถ่ายทอดพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหรือการกลาย และการแสดงออกของสารพันธุกรรมซึ่งยากต่อการแสดงออกให้เห็นเป็นรูปธรรม แต่หลังจากการปฏิบัติการ สิ่งต่างๆ ที่กล่าวนั้นมีความเป็นรูปธรรมมากขึ้น ทำให้นักศึกษาเกิดความสนุก และความสนใจทำให้ทัศนคติต่อการศึกษาวิชานี้เปลี่ยนไปในทางบวกสูงขึ้น

579.0?? ค ๔๖๒ ก.๔ 142676

ในด้านประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ ผู้วิจัยใช้เกณฑ์ในการพิจารณาค่า $E_1 : E_2 = 75 : 75$ โดยการยอมรับประสิทธิภาพมีค่าเบี่ยงเบนได้ ±5% จากเกณฑ์ในการพิจารณาดังกล่าว ปฏิบัติการที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 อยู่ภายในเกณฑ์ ส่วนปฏิบัติการอื่นอยู่ต่ำกว่าเกณฑ์ จึงต้องทำการปรับปรุง มีข้อเสนอแนะในการปรับปรุง ต้องพัฒนาและปรับปรุงเครื่องมือในการวัด และหาสื่ออย่างอื่นมาช่วยเสริมเพื่อทำให้ประสิทธิภาพในส่วนที่ต่ำกว่าเกณฑ์สูงขึ้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผล

ในการศึกษาผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ ทักษะ และทัศนคติ ของนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

1. ความคิดรวบยอดที่เกิดขึ้นหลังจากการปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ปานกลางถึงดี
2. ทักษะการปฏิบัติของนักศึกษาหลังจากการปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ปานกลางถึงดี
3. นักศึกษามีเจตคติที่ดีและมีทัศนคติในทางบวกต่อการเรียนแบบปฏิบัติการ ในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์
4. ผลการทดสอบสมมติฐาน " การเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ สามารถสอนให้ผู้เรียนเกิดความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์สูงขึ้น และผู้เรียนมีทัศนคติทางบวกต่อการทำปฏิบัติการทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์" ได้ผลว่า ความคิดรวบยอดและทัศนคติของนักศึกษาหลังการปฏิบัติการทดลองสูงกว่าก่อนปฏิบัติการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งระดับ .05 และระดับ .01
5. ค่าประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ได้ถูกคำนวณ โดยการหาประสิทธิภาพของกระบวนการ (E_1) และหาค่าประสิทธิภาพของผลลัพธ์ (E_2) และแปลความ โดยเทียบกับเกณฑ์ E_1:E_2 = 75 : 75 ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 อยู่ภายในเกณฑ์ ส่วนปฏิบัติการที่ 1, 2, 8, 9 และ 10 อยู่ต่ำกว่าเกณฑ์ จึงต้องทำการแก้ไขปรับปรุง บทปฏิบัติการ เครื่องมือวัดและ แบบสอบถาม

ข้อเสนอแนะ

1. ผู้วิจัยเสนอแนะว่าบทปฏิบัติการเรื่องพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ให้นักศึกษาเกิดการเรียนรู้ในความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพันธุศาสตร์ เกิดทักษะในการปฏิบัติการ และสามารถนำเทคนิคไปประยุกต์ใช้ทั้งในการวิจัยทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ได้ จึงสมควรที่จะนำไปใช้สอนแทนที่จะใช้การบรรยายหรือทฤษฎีแต่เพียงอย่างเดียว
2. บทปฏิบัติการนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางในการจัดการเรียนการสอนแบบ Laboratory approach สำหรับสถาบันอุดมศึกษา
3. จะต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพของแบบวัดและแบบสอบถาม เพื่อยกระดับประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ
4. ควรมีการพัฒนาและสร้างบทปฏิบัติการในเนื้อหาอื่นให้ครอบคลุม และทำการวิจัยต่อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

บรรณานุกรม

กาญจนา เกียรติประวัติ. วิธีสอนทั่วไปและทักษะการสอน. กรุงเทพฯ ไทยวัฒนาพานิช, 2524.

ชูศรี วงศ์รัตนะ. เทคนิคการใช้สถิติเพื่อการวิจัย. กรุงเทพฯ ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2530

ดนัย เทียนพุฒ. การพัฒนาเกณฑ์การประเมินการจัดดำเนินโครงการประชุมปฏิบัติการวิทยานิพนธ์ ปริญญาครุศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาวิจัยการศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525.

นภาพร สิงหทัต. การพัฒนาชุดการสอนรายบุคคลเพื่อเสริมสร้างสมรรถภาพทางการวิจัยสำหรับครูและบุคลากรการศึกษาประจำการ ปริญญานิพนธ์การศึกษาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2531.

ยุพิน พิพิธกุล. การเรียนการสอนคณิตศาสตร์. กรุงเทพฯ บพิธการพิมพ์, 2523.

ลาวัลย์ พลกล้า. การสอนคณิตศาสตร์แบบปฏิบัติการ. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2523.

ศิริเพ็ญ มากบุญ. การพัฒนาแบบฝึกเพื่อเสริมสร้างสมรรถภาพทางการวิจัยสำหรับนักศึกษาครู สถาบันราชภัฏเทพสตรี ลพบุรี, 2541.

สุจิตรา สุขุมานันท์ การวิจัยเชิงปฏิบัติการ : ผลของการจัดกิจกรรมการเรียนคณิตศาสตร์แบบปฏิบัติการในโรงเรียนที่จัดชั้นเรียนแบบรวมชั้น. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2542.

สำนักมาตรฐานการศึกษา, สำนักงานสภาสถาบันราชภัฏ. หลักสูตรสถาบันราชภัฏพุทธศักราช 2543. กรุงเทพฯ, 2543.

Miller, J. H. A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

Lederberg, J. and Lederberg, E.M. Replica Plating and Indirect Selection by Bacterial Mutants. J. Bacteriol. 63: 39946.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก ก

บทปฏิบัติการพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

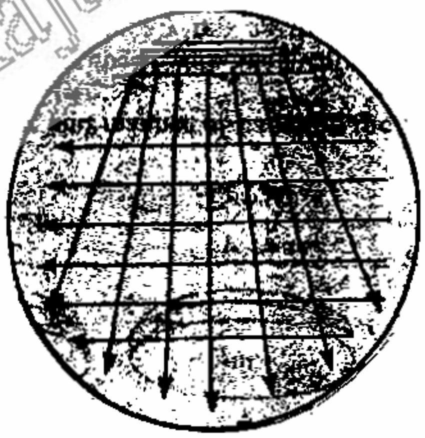
ปฏิบัติการที่ 1 การแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ

(Isolation of Single Colony)

สิ่งที่สำคัญสิ่งหนึ่งในการทำงานทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ ก็อ การทำให้ได้โคโลนีบริสุทธิ์ หรือเทคนิคการทำเชื้อให้บริสุทธิ์ (Pure culture technique) การทำเชื้อให้บริสุทธิ์ หรือการแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ จะทำให้ได้จุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียว (Strain) ไม่มีสายพันธุ์อื่นมาปะปน มีวิธีการหลายวิธีในการทำให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ แต่วิธีการที่ใช้บ่อยที่สุดคือเทคนิคการลากเชื้อบนผิวหน้าอาหารวุ้นหรือสตรีกเพลต (Streak plate technique) และเทคนิคการกระจายเชื้อลงในจานเพาะเชื้อหรือสเปรดเพลต (Spread plate technique) วิธีการต่างๆ เหล่านั้นตั้งอยู่บนพื้นฐานเดียวกันคือการทำการเจือจางแบคทีเรียที่เติบโตโดยทำให้เชื้อบางลงจนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยวๆ ซึ่งสามารถสร้างเป็นโคโลนีของเซลล์ที่มาจากเซลล์ดั้งเดิมเซลล์เดียว

1.1 การลากเชื้อบนผิวหน้าอาหารวุ้นหรือสตรีกเพลต

หลักการของเทคนิคการลากเชื้อบนผิวหน้าอาหารวุ้นหรือสตรีกเพลต คือการนำห่วงถ่ายเชื้อที่ผ่านการลนไฟให้ร้อนแดงและปล่อยให้เย็นไปแตะเชื้อที่ต้องการแยก แล้วนำมาทาลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นโดยลากเชื้อหรือสตรีก (Streak) ไปบนผิวหน้าอาหารวุ้นหลายๆ แนว แนวละหลายๆ เส้น ในแต่ละแนวปริมาณเชื้อจะลดน้อยลงจนกระทั่งแนวสุดท้ายเหลือเพียงเซลล์เดี่ยวๆ (รูปที่ 1.1) เมื่อนำจานเพาะเชื้อที่ลากเชื้อแล้วไปบ่ม เซลล์เดี่ยวๆ ที่แยกออกมานั้นจะเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มเซลล์ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิดเดียวที่เรียกโคโลนี (Colony) นักศึกษาอาจคิดค้นวิธีการลากเชื้อหรือสตรีกวิธีใหม่ๆ ขึ้นเองโดยอาศัยหลักการที่กล่าวมา



รูปที่ 1.1 แนวการลากเชื้อไปบนผิวหน้าอาหารวุ้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

วัตถุประสงค์	1. เพื่อแยกแบคทีเรียให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์	
	2. เพื่อฝึกปฏิบัติเทคนิคการแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ	
วัสดุอุปกรณ์	1. นิวเตรียนท์อาการ์เพลต	2 เพลต
	2. ตะเกียงบุนเสนหรือตะเกียงแอลกอฮอล์	1 ดวง
	3. ห่วงถ่ายเชื้อ	1 อัน
	4. เชื้อผสมของ *Serratia marcescens* ซึ่งมีโคโลนีสีแดง *Micrococcus luteus* ซึ่งมีโคโลนีสีเหลือง และ *Escherichia coli* ซึ่งมีโคโลนีสีขาว	

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ทำการแยกเชื้อผสม 3 ชนิด ที่มีลักษณะแตกต่างกันที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว โดยปฏิบัติตามเทคนิคการลากเชื้อบนผิวหน้าอาหารวุ้นหรือสตรีกเพลต
2. บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. ตรวจดูโคโลนีที่แยกออกจากโคโลนีอื่นๆ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. วาดการกระจายของโคโลนี เพื่อที่จะวินิจฉัยโคโลนีให้ใช้ดินสอสีเหลืองแทนโคโลนีของ *Micrococcus luteus* สีแดงแทนโคโลนีของ *Serratia marcescens* สีดำแทนโคโลนีของ *Escherichia coli*
5. ให้ทำการทดลองซ้ำเพื่อปรับปรุงเทคนิคการแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ

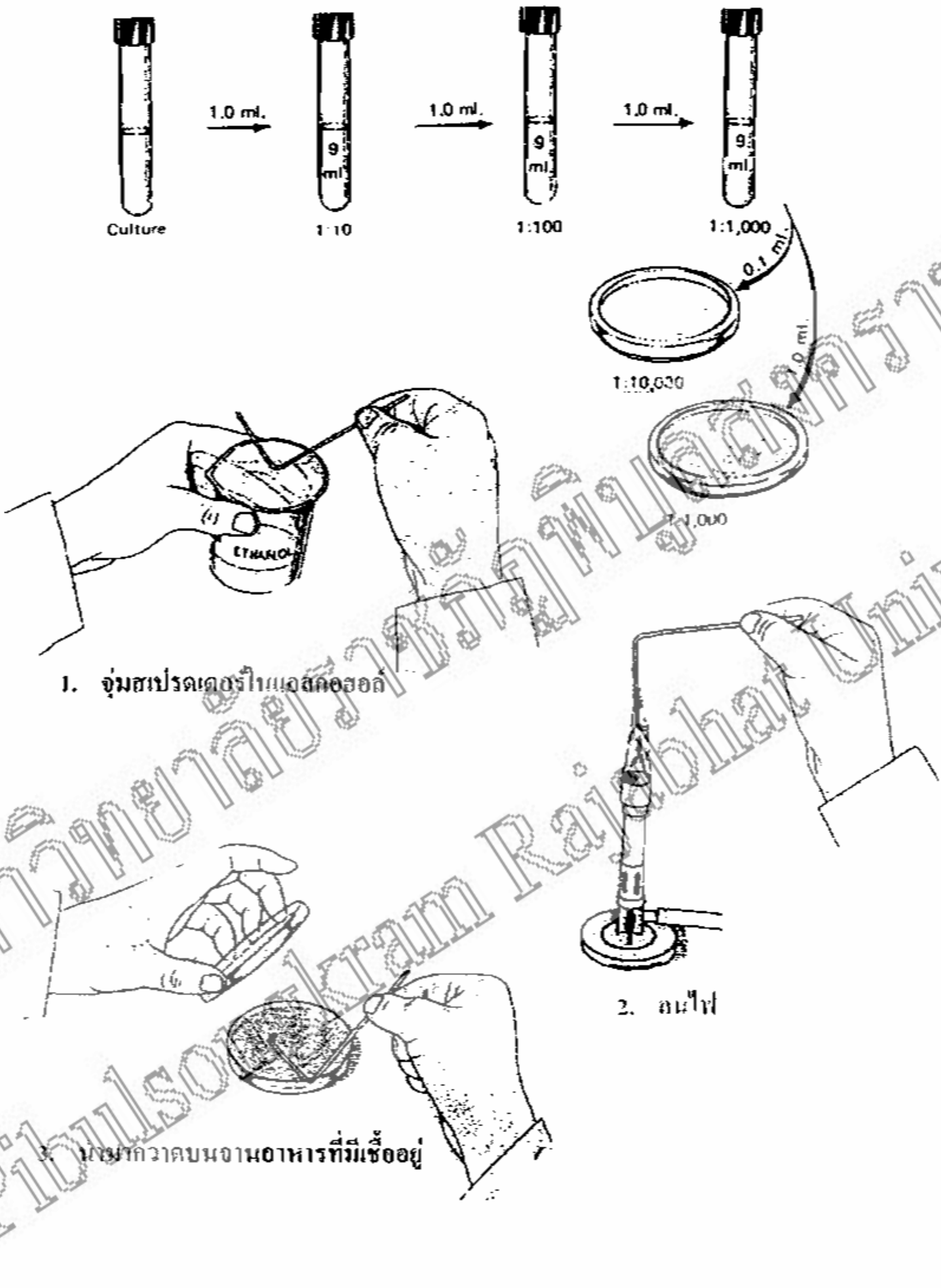
1.2 การกระจายเชื้อลงในจานเพาะเชื้อหรือสเปรดเพลต

การกระจายเชื้อลงในจานเพาะเชื้อหรือสเปรดเพลตเป็นเทคนิคที่ต้องทำควบคู่ไปกับเทคนิคการทำให้เจือจางเป็นลำดับ (Serial dilution techniques) เทคนิคทั้งสองนี้เป็นเทคนิคที่ทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และสามารถใช้วินิจฉัยจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ศึกษา การทำให้เชื้อเจือจางเป็นลำดับนั้น ทำได้โดยวัดปริมาตรหรือชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่จะทำให้เจือจางให้ได้ 1 มล. หรือ 1 กรัม ใส่ลงในขวดเจือจางที่ มีน้ำกลั่นอยู่ 9 มล. แล้วจึงทำการเจือจางลงเป็นลำดับโดยถ่ายส่วนผสมไปยังขวดเจือจางที่มีน้ำกลั่นอยู่ 9 มล. ขวดถัดไปครั้งละ 1 มล. โดยใช้ปิเปตตามเทคนิคการใช้ปิเปต การเจือจางเช่นนี้จะเป็นการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า การกระจายเชื้อลงในจานเพาะเชื้อหรือสเปรดเพลต เทคนิคนี้เป็นการใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดเชื้อที่เจือจาง ไปหยดบนผิวของอาหารแข็งที่อยู่ในจานจานละ 1 มล. หรือ 0.1 มล. แล้วใช้แท่งแก้วที่ปลายงอเป็นมุมฉากหรือรูปสามเหลี่ยมที่เรียกสเปรดเดอร์ ผ่านการฆ่าเชื้อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ auld ปล่อยให้เย็น แล้วนำมากวาดบนจานอาหารที่มีเชื้ออยู่ เพื่อให้เชื้อกระจายไปทั่วจาน และปิดฝาจาน นำจานอาหารไปเพาะเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

วัสดุอุปกรณ์

1.	นิวเตรียนท์อาการ์เพลต	4 เพลต
2.	หลอดเจือจางที่มีน้ำกลั่น 9 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	7 หลอด
3.	ปิเปตขนาด 1 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในกระบอกใส่ปิเปต	10 อัน



รูปที่ 1.2 การเจือจางโดยใช้ปิเปตและการสเปรดเพลต

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

4. เชื้อผสมที่ประกอบด้วย *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, และ *Escherichia coli* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

วิธีปฏิบัติ

1. ทำการเจือจางเชื้อผสมโดยปฏิบัติตามเทคนิคการทำให้เจือจางโดยใช้ปิเปต ทำการเจือจางเชื้อผสมให้ได้ $1{:}10^4$, $1{:}10^5$, $1{:}10^6$, และ $1{:}10^7$
2. ทำการแยกเชื้อผสมโดยปฏิบัติตามเทคนิคการกระจายเชื้อลงในจานเพาะเชื้อหรือสเปรดเพลต โดยทำการสเปรดเพลตจากเชื้อผสมที่เจือจาง $1{:}10^4$, $1{:}10^5$, $1{:}10^6$, และ $1{:}10^7$ อย่างละ 1 มล. ลงบนนิวเตรียนท์อาการ์เพลต
3. บ่มเชื้อไว้ในตู้เพาะเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
4. ตรวจดูจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 เพื่อดูโคโลนีที่เกิดขึ้น ให้บันทึกความหนาแน่นของโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 โดยใช้ดินสอสี ถ้าจานที่มีโคโลนีหนาแน่นมากให้วาดเพียง 1/4

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม 1. เพราะเหตุใด การสตรีกเพลตและการทำเชื้อให้เจือจางควบคู่กับการสเปรดเพลตจึงสามารถแยกแบคทีเรียให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ

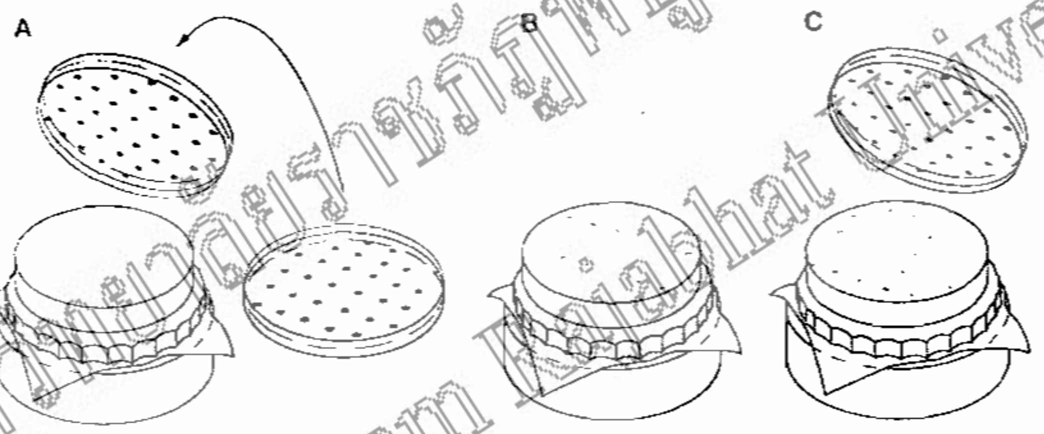
2. สารพันธุกรรมของเซลล์แต่ละเซลล์ในโคโลนีเดียวกันมีความเหมือนหรือต่างกันอย่างไร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 2 เรพลิกา เพลตติง

(Replica Plating)

เรพลิกา เพลตติง (รูปที่ 1) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ หลักการของวิธีนี้คือการทำให้เกิดรอยพิมพ์ (Imprint) ของแบคทีเรียจากอาหารวุ้นลงบนผิวเช่นผ้ากำมะหยี่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และถ่ายทอดรอยพิมพ์นี้ไปยังอาหารวุ้นจานที่ 2 แบคทีเรียติดอยู่บนผ้ากำมะหยี่มากกว่าที่ผิวอาหารวุ้น ดังนั้นผ้ากำมะหยี่เดียวกันสามารถถ่ายแบคทีเรียไปได้หลายครั้ง สามารถใช้กระดาษกรองบางชนิดแทนผ้ากำมะหยี่ซึ่งสามารถทิ้งหลังจากที่ทำการถ่ายเทแบคทีเรียแล้ว แต่เพื่อให้ผลดีที่สุดเสนอแนะให้ใช้ผ้ากำมะหยี่ ซึ่งต้องล้างและทำให้แห้งก่อนฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) สามารถเรพลิกาเพลตติงโคโลนีโดยตรงลงบนเพลตที่เลือก (รูปที่ 2.1) ซึ่งแบคทีเรียจะเติบโต สามารถใช้ไม้จิ้มฟันด้านป้านในการถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากเพลตหนึ่งไปอีกเพลตหนึ่ง ไม้จิ้มฟันสามารถถ่ายเชื้อได้ในปริมาณมากๆ และสามารถทำให้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อโดยการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ โคโลนีที่อยู่บนกริดให้ผลที่ชัดเจนกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำเรพลิกาจำนวนมาก



รูปที่ 2.1 A ตรึงผ้ากำมะหยี่ลงบนแท่นเรพลิกาเพลตติง นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของแบคทีเรียเติบโตอยู่ประทับไปบนผ้ากำมะหยี่ B รอยพิมพ์แบคทีเรียติดบนผ้ากำมะหยี่ C นำจานอาหารวุ้นที่ว่างเปล่าประทับไปบนผ้ากำมะหยี่เพื่อถ่ายแบคทีเรียที่ติดบนผ้ากำมะหยี่ (Miller, 1992)

วัตถุประสงค์ เพื่อฝึกปฏิบัติการขยายพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธีเรพลิกาเพลตติง

วัสดุอุปกรณ์ 1. โคโลนีแบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารวุ้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

2. ตะเกียงบุนเสนหรือตะเกียงแอลกอฮอล์ 1 ดวง
3. ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 บีกเกอร์
4. แผ่นกริด (Grid) สำหรับ 50 โคโลนี 2 แผ่น
5. ผ้ากำมะหยี่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อพร้อมแท่นเรพลิกาเพลตติง 1 ผืน
6. นิวเตรียนท์อาการ์เพลต 4 เพลต

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. นำแบคทีเรียที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ที่อยู่ในจานอาหารวุ้น (จากปฏิบัติการที่ 1) มาทำเรพลิกาเพลตติงโดยใช้ผ้ากำมะหยี่ ทำการเรพลิเคต (Replicate) 3 เพลต
2. นำแบคทีเรียที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวที่อยู่ในจานอาหารวุ้น (จากปฏิบัติการที่ 1) มาทำเรพลิกาเพลตติงโดยใช้ไม้จิ้มฟันถ่ายแบคทีเรียทีละโคโลนีลงบนแผ่นตารางหรือกริดสำหรับ 50 โคโลนี ทำการเรพลิเคต 3 เพลต
3. บ่มเรพลิเคตเพลตไว้ในตู้บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
4. ตรวจดูโคโลนีที่เรพลิเคตโดยใช้ผ้ากำมะหยี่และใช้ไม้จิ้มฟันป้ายลงบนกริด
5. เปรียบเทียบผลของการเรพลิเคตทั้ง 2 วิธี วิธีการใดที่ให้โคโลนีเติบโตดีกว่ากัน

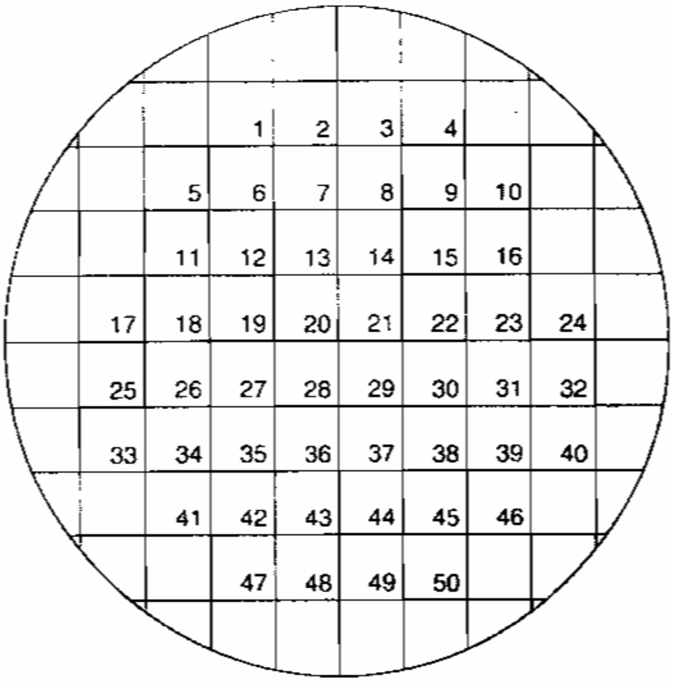
บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

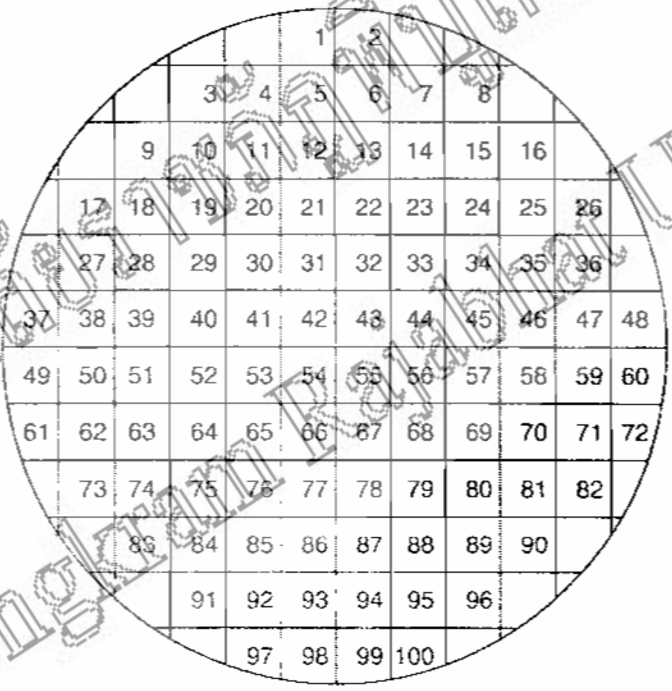
คำถาม 1. ถ้าสกัด DNA จากเซลล์โคโลนีต้นแบบ และDNA จากรอยพิมพ์และนำมาเปรียบเทียบลำดับเบส ท่านคิดว่าลำดับเบสของดีเอ็นเอจาก 2 แหล่งนี้เหมือนหรือต่างกันกี่เปอร์เซ็นต์

2. เทคนิคเรพลิกาเพลตติ้งมีความสำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์อย่างไร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



Grid for 50 colonies



Grid for 100 colonies

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

รูปที่ 2.2 แผ่นตารางหรือกริด สำหรับ 50 และ 100 โคโลนี (Miller, 1992)

ปฏิบัติการที่ 3 การดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย

(Maintaining Bacterial Strains)

ในการทำงานทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ เมื่อคัดเลือกได้สายพันธุ์ที่ต้องการจำเป็นที่จะต้องเก็บรักษาจีน (Gene) ให้คงอยู่ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป หรือเพื่อที่จะส่งไปให้นักวิจัยอื่นๆ ที่ต้องการศึกษา และสามารถนำมาใช้เมื่อต้องการ ในสภาพธรรมชาติจุลินทรีย์อาจสูญพันธุ์หรือกลายพันธุ์ได้ทุกเวลา ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการวางแผนดูแลรักษาสายพันธุ์ ได้แก่จำนวนสายพันธุ์ที่จะทำการเก็บรักษา ความถี่ที่จะนำสายพันธุ์มาใช้ สิ่งอำนวยความสะดวกที่มี ชนิดของพื้นฐานสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ต่างๆ ความสามารถที่จะทดแทนสายพันธุ์เฉพาะถ้าสายพันธุ์นั้นสูญหาย การเก็บรักษาจุลินทรีย์กระทำได้หลายวิธีเช่น วิธีทำให้แห้ง วิธีเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ วิธีการที่ปฏิบัติเป็นประจำในห้องปฏิบัติการมีวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การแช่แข็งเชื้อที่เพาะเลี้ยงที่ –70 °C (Solid Frozen Cultures) สามารถเก็บสะสมเชื้อที่เพาะเลี้ยงในกลีเซอรอล (Glycerol) 10-16% ภาชนะที่บรรจุมักใช้ ขวดเล็กๆ (Vials) ที่ผ่านการทำไร้เชื้อ (Sterile) การเก็บเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้จุลินทรีย์จะยังคงมีชีวิตได้มากกว่า 5 ปี สามารถทำให้เชื้อจากการเก็บเชื้ออย่างถาวร (permanent culture) เติบโตขึ้นมาใหม่โดยเพียงแต่ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ ตักเชื้อที่แช่แข็งใส่ในอาหารใหม่และปล่อยให้เติบโตข้ามคืน (Growing overnight) สามารถเก็บเชื้อถาวรกลับเข้าไปใหม่ที่ –70 °C โดยไม่ต้องทำให้ละลาย ข้อจำกัดของการใช้การเก็บรักษาสายพันธุ์โดยวิธีนี้คือพื้นที่ในตู้แช่แข็ง (Freezer) สิ่งสำคัญที่ต้องจำไว้คือต้องมีระบบควบคุมให้อุณหภูมิของตู้แช่แข็งคงที่ที่ –70 °C และต้องมีสัญญาณเตือนเมื่อไฟดับและตู้ไม่ทำงาน การละลายและการแช่แข็งใหม่ทำให้เกิดการเสียหายต่อความมีชีวิตของเชื้อ เพื่อป้องกันปัญหาร้ายแรงที่จะเกิดขึ้นจึงควรเก็บเชื้อสายพันธุ์ที่สำคัญไว้เป็นหลอดสำรองในอีกที่หนึ่ง สายพันธุ์บางสายพันธุ์สูญเสียความมีชีวิตได้อย่างเร็วที่อุณหภูมิต่ำ ข้อเสนอแนะจึงควรทดสอบความมีชีวิตของสายพันธุ์ในภาวะการเก็บรักษา กลีเซอรอลความเข้มข้นต่ำ 4-8 % ช่วยเพิ่มความมีชีวิต สามารถเก็บสะสมสายพันธุ์ไว้ใน 8 % ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide = DMSO) ที่ -70°C เนื่องจากกลีเซอรอลมีความหนืดจึงยากที่จะใช้ปิเปตตวงกลีเซอรอล ในการตวงกลีเซอรอลต้องใช้กระบอกตวง หรือถ้าจะใช้ปิเปต ให้ทำการเจือจางกลีเซอรอลโดย เติมน้ำกลั่นลงในกลีเซอรอลเพื่อให้เป็นสารละลายกลีเซอรอล 80 % นำมาทำเป็น stock แล้วจึง Autoclave ใช้สารละลาย Stock ในการเตรียมเชื้อเพื่อเก็บรักษา ผสมสารละลายเซลล์ปริมาตรเท่าๆ กันเข้ากับกลีเซอรอล 20 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จะทำให้ได้เชื้อที่เพาะเลี้ยงในกลีเซอรอล 10 % ปกติใช้หลอดทดสอบที่มีปริมาตร 5 มล. เพื่อสะสมเชื้อที่เพาะเลี้ยงในกลีเซอรอล ในการเตรียม นำตัวอย่างเชื้อที่เพาะเลี้ยงใหม่ๆ 2 มล. เติม 80 % กลีเซอรอล 0.5 มล. ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ กลีเซอรอล 16 % เขย่าผสมให้เข้ากันดี และเก็บไว้ที่ –70 °C ให้ทำเครื่องหมายด้วยหมึกที่ไม่ลบเลือนเมื่อได้รับผลจากความชื้นในตู้แช่แข็ง

2. การเก็บรักษาในสภาพเหลวใน 40 % กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิระหว่าง -15 °C และ – 20°C วิธีการเก็บรักษาโดยวิธีนี้มีความสะดวกเพราะสามารถใช้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อปกติได้ สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อให้เติบโตขึ้นใหม่โดยเพาะเชื้อด้วยหยดของของเหลวจากของเหลวที่เก็บรักษาลงในอาหารใหม่และปล่อยให้เติบโตข้ามคืน สายพันธุ์หลายสายพันธุ์จะยังคงมีชีวิตเป็นเวลาหลายปีภายใต้สภาวะเหล่านี้ สายพันธุ์บางสายพันธุ์ไม่สามารถอยู่รอดด้วยดี สามารถเพิ่มความอยู่รอดโดยการเก็บรักษาสายพันธุ์ในอาหารปริมาณต่ำสุดซึ่งปล่อยให้มันเติบโตก่อนที่จะใส่ กลีเซอรอล หรือโดยการหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงทำให้กลายเป็นสารแขวนลอยใหม่ (Resuspended) ในบัฟเฟอร์ (Buffer) ก่อนที่จะเติมกลีเซอรอล ความมีชีวิตของเซลล์ที่เก็บรักษาโดยวิธีนี้จะน้อยกว่าเก็บรักษาไว้ที่ –70°C ในที่นี้เก็บเชื้อเพาะเลี้ยงในตู้แช่แข็งที่ –20 °C ในห้องปฏิบัติการมาตรฐานซึ่งรักษาอุณหภูมิได้คงที่กว่าส่วนแช่แข็งในตู้เย็นปกติ

3. สแตบ (Stabs) วิธีการที่เป็นที่นิยมในการเก็บรักษาสายพันธุ์คือการสแตบลงในขวดเล็กๆ ที่มี Rich nutrient medium หรือ Selective medium วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งในการเก็บรักษาสายพันธุ์ในปริมาณมากๆ เนื่องจากสายพันธุ์สามารถมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 5 ปี ในสแตบที่เก็บอย่างเหมาะสม เพราะขวดเล็กๆ ที่มีเชื้อที่สแตบนั้นง่ายต่อการขนส่ง และทำลำดับรายการ (Catalog) การเก็บรักษาสแตบไว้ในห้องที่มืดและไกลจากแหล่งความร้อนเป็นสิ่งสำคัญต่อการดำรงรักษาความมีชีวิตและจะต้องปิดหลอดสแตบ ให้อากาศเข้าไม่ได้ (Airtight) โดยการปิดหลอดด้วยพาราฟีน (Paraffin) ที่หลอมละลาย

4. โคโลนีบน เพทริดิช (Colonies on Petri Dishes) การเก็บรักษาโคโลนีบนเพทริดิชเป็นวิธีที่สะดวกมากสำหรับเก็บสายพันธุ์ที่เลือกจำนวนมาก ประโยชน์ของวิธีนี้คือสามารถนำโคโลนีเดี่ยวๆ ของสายพันธุ์นี้มาใช้ได้ทันที ถ้าเป็นการเก็บวิธีอื่นจำเป็นต้องทำให้เกิดโคโลนีเดี่ยวๆ ขึ้นมาใหม่ และบางครั้งจำเป็นต้องทดสอบสายพันธุ์ใหม่เพื่อดูลักษณะจำเพาะ ก่อนใช้สายพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้ ถ้าใช้สายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง ต้องเก็บรักษาโคโลนีบริสุทธิ์บน Selective medium ที่เหมาะสมในตู้เย็น เพลตเช่นนั้นมีอายุอยู่ได้ 1 หรือ 2 สัปดาห์ แต่สามารถเพิ่มอายุอยู่ได้เป็นเวลาหลายเดือนโดยหุ้มด้วยพาราฟิล์ม (Parafilm) รอบนอก พาราฟิล์มจะก่อให้เกิด Airtight seal จึงแนะนำให้ใช้อย่างมาก สามารถเก็บสายพันธุ์บนเพลตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหลายวันจนถึง 1–2 สัปดาห์ วิธีการนี้เป็นการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีวิธีหนึ่งที่ใช้ในการคัดเลือกลักษณะเฉพาะก่อนที่จะตัดสินใจว่าจะเก็บมันอย่างถาวรหรือไม่ สายพันธุ์ที่สตรีก (Streak) บนอาหารปริมาณต่ำสุด มีชีวิตยาวนานกว่าสายพันธุ์ที่เติบโตและเก็บไว้ในอาหารที่อุดมสมบูรณ์

5. อาหารเหลวในตู้เย็น เชื้อที่เก็บรักษาโดยวิธีนี้มีชีวิตอยู่ในช่วงเวลาสั้นๆ จากหลายวันถึง 1 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ วิธีนี้ไม่ดีกว่าเก็บเพลตในในที่เย็น แต่บางครั้งจำเป็นที่ต้องใช้เพาะกล้าในหลอดใหม่ เลี้ยงเชื้อให้เติบโตและหมุนเหวี่ยงเซลล์ลงและทำให้กลับเป็นสารแขวนลอยใหม่ (Resuspend) ในบัฟเฟอร์ และเก็บในตู้เย็น

Pibulsongkram Rajabhat University

วัตถุประสงค์ 1. เพื่อฝึกเทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้อยู่ในสภาพมีชีวิต
2. เพื่อศึกษาความมีชีวิตของจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา

วัสดุอุปกรณ์

1. นิวเตรียนท์บรอท	2	หลอด
2. ตะเกียงบุนเสนหรือตะเกียงแอลกอฮอล์	1	ดวง
3. ห่วงถ่ายเชื้อ	1	อัน

4. 80 % Glycerol
5. เชื้อ *Serratia marcescens* ซึ่งมีโคโลนีสีแดง *Micrococcus luteus* ซึ่งมีโคโลนีสีเหลือง และ *Escherichia coli* ซึ่งมีโคโลนีสีขาว

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ทำการเพาะเชื้อ *Serratia marcescens* หรือ *Micrococcus luteus* หรือ *Escherichia coli* ลงในนิวเตรียนท์ บรอท
2. บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. เติมสารละลาย 80 % Glycerol 1 มล. ลงใน หลอดที่ได้ถ่ายเชื้อที่เติบโต 1 มล.
4. ใส่ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิระหว่าง –15 °C และ – 20 °C
5. ศึกษาการมีชีวิตของแบคทีเรียที่เก็บในตู้แช่แข็งทั้ง 2 หลังจากเก็บไว้ในตู้แช่แข็งเป็นเวลา 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน โดยถ่ายเชื้อที่เก็บนั้น 1 ห่วงลวดลงในอาหารใหม่และบ่มทิ้งไว้เป็น เวลา 24-48 ชั่วโมง

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม 1. เพราะเหตุใดจึงใส่กลีเซอรอลในการเก็บรักษาเชื้อก่อนแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 4 การไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization)

การไลโอฟิไลเซชันเป็นวิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์อีกวิธีหนึ่ง วิธีนี้เป็นวิธีการที่ทำให้สายพันธุ์เย็นจัดและแข็งตัวในสภาพสุญญากาศ น้ำในเซลล์ระเหิดออกจากเซลล์ จุลินทรีย์จึงอยู่ในสภาพแข็งแห้ง (Freeze-drying) ในหลอดแก้วแอมพูล (Glass ampules) เล็กๆ น้ำจะถูกดึงออกจากแบคทีเรียที่แขวนลอยที่เย็นจัดจนแข็งโดยการระเหิด (Sublimation) ภายใต้ความดันที่ลดลง (Reduced pressure) วิธีการนี้เป็นวิธีการที่เป็นแบบอย่างในการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ในระยะยาวที่สุด เนื่องจากสายพันธุ์ที่ถูกไลโอฟิไลซ์จะมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 10 ปี วิธีการนี้จึงเป็นวิธีการถาวรในการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่สำคัญอีกชุดหนึ่ง มักจะทำการเก็บสายพันธุ์ที่ไลโอฟิไลซ์หลายๆ หลอด เพราะในการนำสายพันธุ์ที่ไลโอฟิไลซ์มาใช้ต้องทำให้ขวดแก้วแตกและจะต้องทำการเก็บสายพันธุ์ใหม่ทุกครั้งที่นำสายพันธุ์มาใช้ซึ่งเป็นเรื่องที่ยุ่งยาก

วิธีการแข็ง-แห้ง (Freeze-drying) ในการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์มี 2 วิธีคือวิธีหลอดแก้วคู่ (Double vial method) และวิธีแมนิโฟลด์ (Manifold method) อุปกรณ์ที่ใช้มี หลอดแก้ว (Vials) ถ้าทำการแช่แข็งเซลล์และทำให้แห้งในช่องให้ใช้หลอดแก้วคู่ (Double vials) หลอดแก้วคู่นี้ง่ายต่อการจับถือและเกิดการปนเปื้อนได้เล็กน้อย จึงสามารถใช้เก็บรักษาเชื้อโรคที่เป็นอันตราย ถ้าทำการแช่แข็งเซลล์และทำให้แห้งโดยตรงโดยยึดติดเข้ากับแมนิโฟลด์ (Manifold) ให้ใช้หลอดแก้วเล็กๆ เดี่ยวๆ สำหรับหลอดแก้วคู่ให้ใช้หลอดแก้ว ฟลินต์ที่มีปลอกหุ้มเล็กๆ (Flint glass shell vial) ขนาด 11.5 มม. X 35 มม. เป็นหลอดแก้วใน ส่วนหลอดแก้วนอกขนาด 14.25มม. X 85 มม. ก่อนนำมาใช้ต้องทำให้หลอดแก้วนี้นำมาทำให้ไร้เชื้อ ทำเครื่องหมายหลอดแก้วโดยใช้หมึกที่ไม่หลุดลอกเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำหรือแช่อยู่ในตัวทำละลายเช่นแอลกอฮอล์

เชื้อที่เพาะเลี้ยงที่จะประสบผลสำเร็จต้องเป็นเซลล์ที่เติบโตอย่างสมบูรณ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด เพาะเลี้ยงให้เซลล์เติบโตโดยให้มีจำนวนเซลล์ 10^8 เซลล์/มล. เก็บเกี่ยวเซลล์ในเวลาที่มีเสถียรภาพและมีความมีชีวิตสูงสุดในระยะ Logarithamic หรือ Early stationary phase เตรียมเซลล์ที่จะทำการไลโอฟิไลเซชันโดยทำให้เป็นสารแขวนลอยใน ไครโอโพรเทคทีฟเอเจนต์ (Cryoprotective agents) เช่น 20% สกิมมิลค์ (Skim milk) สำหรับหลอดแก้วคู่ หรือ 12% สารละลายซูโครส (Sucrose solution) สำหรับหลอดแก้วเดี่ยว หรือใช้ 10% เดกซ์แทรน (Dextran) เซรุ่มม้า (Horse serum) อิโนสิทอล (Inositol) หรือสารเคมีอื่นๆ ที่เป็นไครโอโพรเทคทีฟเอเจนต์ (Cryoprotective agents)

เครื่องมือที่ทำให้เย็นจัดจนแข็งและแห้ง มีตั้งแต่ระบบเครื่องสูบสุญญากาศ-เดซิกเคเตอร์ (Desiccator-vacuum pump system) และเครื่องแข็งแห้ง (Freeze dryer) ที่มีราคาสูง ระบบประกอบด้วยมาตรบอกแรงดันสุญญากาศ เครื่องสูบสุญญากาศที่ความดันสูง คอนเดนเซอร์ และช่องที่มีแผ่นพลาสติกที่ทำให้เกิดการปิดผนึกอย่างดี ซึ่งเหมาะสำหรับเครื่องสูบสุญญากาศหรือแมนิโฟลด์ (Manifold) การไลโอฟิไลซ์โดยวิธีการขวดคู่ (Double-vial) มีขั้นตอนดังนี้ :-

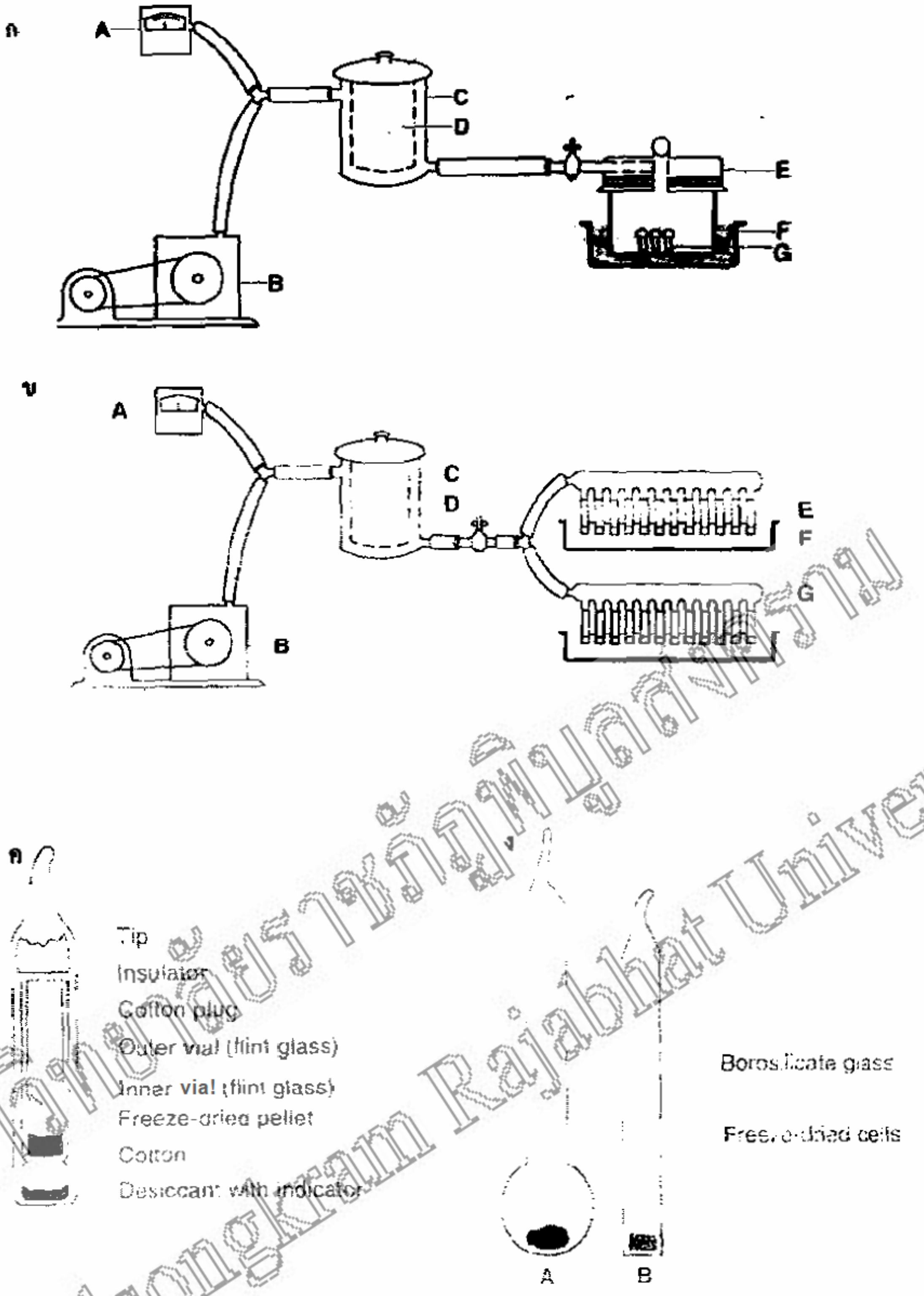
Pibulsongkram Rajabhat University

1. เตรียมขวดนอกและขวดใน
   ก. ใส่ซิลิกาเจลแกรนูลไว้ที่ก้นขวดด้านนอก และใส่สำลีให้เป็นเบาะระหว่างฉนวนด้านใน อบขวดนอกไว้ตลอดคืนที่ 100 °C เมื่อได้รับความร้อนซิลิกาเจลจะเป็นสีน้ำเงินเข้มและควรจะมีสีเข้มในระหว่างปิดผนึกและเก็บเชื้อที่เพาะเลี้ยง
   ข. ค่อยๆ ปิดจุกหลอดในของระบบหลอดคู่และทำให้ไร้เชื้อโดยทำให้ไร้เชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
   ค. ทำเครื่องหมายหลอดและอบในตู้อบที่ 160 °C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้หมึกแห้ง
2. เตรียมสารละลายสกิมมิลค์ 20 % (W/V) และทำสารละลายให้ไร้เชื้อในปริมาตรน้อยๆ เป็นเวลา 20 นาทีที่ 116 °C หลีกเลี่ยงการให้ความร้อนสูงเกินไป
3. เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เติบโตบนผิวอาหารวุ้นโดยวิธีทำให้ไร้เชื้อ และล้างด้วยสารละลายสกิมมิลค์ 20% เก็บเกี่ยวเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงเซลล์แบบทำให้ไร้เชื้อ และทำให้เพลเลตเป็นสารแขวนลอยในสกิมมิลค์ที่ทำไร้เชื้อเพื่อให้สารแขวนลอยมีเซลล์อย่างน้อย 10^6 เซลล์ต่อมล.
4. ดึงจุกสำลีออกและแจกจ่ายสารแขวนลอยของเซลล์ 0.2 มล. เข้าไปในขวดเล็กๆ แต่ละขวด แช่แข็งเซลล์ในตู้แช่แข็งที่ –60 °C - (–65 °C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจาก 1 ชั่วโมงแช่ในน้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
5. เตรียมกับดักความชื้นโดยการทำให้ก้อนน้ำแข็งแห้งมีความพอเหมาะกับคอนเดนเซอร์ ปิดจุกในแนวสุญญากาศระหว่างแผ่นพลาสติกและคอนเดนเซอร์ Evacuate system ต่ำกว่า 30 μm ของปรอท
6. ดำเนินการทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ที่ 20-30 μm ของปรอทเป็นเวลา 18 ชั่วโมง
7. ดึงเอาขวดเล็กๆ ที่มีซิลิกาเจลออกจากโอเวนและวางในกล่องที่แห้งและปล่อยให้เย็นลง
8. ปิดสตอปคอก (Stopcock) ระหว่างแผ่นพลาสติกและคอนเดนเซอร์ เชื่อม outlet ของแผ่นพลาสติกเพื่อปล่อยให้อากาศแห้งจากช่องซิลิกาเจลเข้าสู่ ถาดสแตนเลส ถ่าย Vial เข้าสู่กล่องแห้ง ใส่ขวดเล็กๆ แต่ละอันเข้าไปใน ขวดเล็กๆ ข้างนอก
9. ดึงขวดคู่ออกจากกล่องแห้งและทำให้ขวดนอกร้อนเหนือเปลวไฟ ดึงให้ขวดแก้วคอดและให้กลายเป็นหลอดแคบๆ
10. ปล่อยให้ขวดเย็นนำติดเข้ากับแมนิโฟลด์ (Manifold) ใช้จุกยางเดี่ยวๆ ปิดปลายของขวดเล็กๆ ที่เปิดออก ทำให้ความดันลดลงโดยปล่อยให้อากาศเข้า (Evacuate)ให้น้อยกว่า 5 μm ของปรอท ปิดผนึกขวดเล็กๆ ที่รอยคอดของแดพิลารีด้วยคู่ออลทิพแอร์แก๊สทอร์ช(Dual-tipped air gas torch)
11. เก็บขวดเล็กๆ ที่ 4°C

วัตถุประสงค์ เพื่อฝึกปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการ ไลโอฟิไลเซชัน

วัสดุอุปกรณ์ 1. นิวเตรียนท์บรอท 2 หลอด

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



รูปที่ 4.1 วิธีการทำให้แข็งแห้ง ก. แบบขวดคู่ ข. แบบแมนิโฟลด์ A = Vacuum gauge B = Vacuum pump C = Condenser D = Reservoir filled with dry ice E = Specimen vial F = Stainless-steel pan filled with crushed dry ice G= Manifold ค. ขวดคู่ (Double vial) ง. ขวดเดี่ยว (Single vials) (Miller, 1992)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

2. ตะเกียงบุนเสนหรือตะเกียงแอลกอฮอล์

3. ห่วงถ่ายเชื้อ 1 อัน

4. เครื่องเซนตริฟิวจ์ 1 เครื่อง

5. หลอดเซนตริฟิวจ์ 2 หลอด

6. เชื้อ *Serratia marcescens* , *Micrococcus luteus* หรือ *Escherichia coli* อย่างใดอย่างหนึ่ง

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ทำการเพาะเชื้อ *Serratia marcescens* หรือ *Micrococcus luteus* หรือ *Escherichia coli* ลงในนิวเตรียนท์ บรอท 3 มล.
2. บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. นำเชื้อที่บ่มไว้มาทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อให้ได้ เพลเลต
4. เทส่วนลอย (Supernatant) ทิ้ง
5. นำเพลเลตไปแช่แข็งที่ –30 °C ถึง -80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. นำเพลเลตที่แช่แข็งมาทำการไลโอฟิไลซ์ในเครื่องไลโอฟิไลซ์ จนแห้งเป็นเวลาประมาณ 12 – 18 ชั่วโมง
7. ศึกษาการมีชีวิตของแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน โดยนำแบคทีเรียที่เก็บนั้นนั้น ใส่ลงในอาหารใหม่และบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม เพราะเหตุใดการเก็บรักษาโดยวิธีไลโอฟิไลซ์เซชัน จุลินทรีย์จึงมีชีวิตอยู่ได้นานเป็นสิบปี

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 5 การกลาย (Mutation) และการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (Selection of Mutation)

การกลาย (Mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับเบสของดีเอ็นเอที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอนี้อาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของฟีโนไทป์ ในระหว่างที่แบคทีเรียเติบโตเซลล์ของแบคทีเรียบางเซลล์อาจมีการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างบังเอิญ (Spontaneous mutation) หรืออาจถูกเหนี่ยวนำ (Induce mutation) โดยสารเคมีหรือปัจจัยทางกายภาพ รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet radiation = UV) ที่ *260* nm สามารถฆ่าประชากรของเซลล์ได้ถึง *90-95%* รังสีอัลตราไวโอเลตส่งผลโดยตรงต่อดีเอ็นเอโดยเหนี่ยวนำให้เกิดพิริมิดีนไดเมอร์ (Pyrimidine dimers) ซึ่งพิริมิดีนเบส 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันเชื่อมกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ ทำให้ในขณะถ่ายแบบโอกาสที่ ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจะสอดใส่เบสที่ผิดเพิ่มสูงขึ้น หลอด Germicidal lamp เป็นแหล่งที่ปล่อยรังสี UV ในช่วง 260 nm ที่จะนำมาใช้ในการทำให้เกิดกระบวนการกลาย (Mutagenesis) โดยใช้ความเข้มข้น (Dose) ต่ำๆ ปฏิบัติการนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นอย่างบังเอิญกับการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยรังสี UV ในการเกิดสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin-Resistant mutants) การสร้างสายพันธุ์กลายทำได้โดยการทำให้แบคทีเรียนี้เติบโตในเกรเดียนต์เพลต (Gradient plate) ที่ประกอบด้วยชั้นของอาหารที่มีลักษณะคล้ายลิ่มที่แตกต่างกัน 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นนิวเตรียนท์อาการ์เปล่าๆ ชั้นบนเป็นนิวเตรียนท์อาการ์ที่มีสเตรปโตมัยซิน สารปฏิชีวนะอยู่ที่ชั้นบนเท่านั้น สารปฏิชีวนะจึงมีแนวโน้มที่จะแพร่ลงสู่ชั้นล่างทำให้เกิดเกรเดียนท์ของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะจากต่ำไปสูง การศึกษาการกลายอย่างบังเอิญทำได้โดยกระจาย *E. coli* โดยวิธีสเปรดเพลตให้ทั่วผิวของสเตรปโตมัยซินนิวเตรียนท์อาการ์เกรเดียนต์เพลตและปล่อยให้เติบโตที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-7 วัน และเมื่อต้องการศึกษาผลของรังสี UV ต่อการกลายทำได้โดยนำ *E. coli* ที่กระจายทั่วผิวของสเตรปโตมัยซินนิวเตรียนท์อาการ์เกรเดียนต์เพลตไปผ่านรังสี UV ก่อนนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เกรเดียนท์เพลตที่ใช้ในการทดลองนี้จะมีสเตรปโตมัยซินความเข้มข้นสูงถึง 100 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 มล.

รูปที่ 5.1 นิวเตรียนท์อาการ์สเตรปโตมัยซินเกรเดียนท์เพลต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการกลายอย่างบังเอิญและอัตราการกลายเนื่องจากรังสี UV

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

2. เพื่อแยกสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสเตรปโตมัยซิน

วัสดุอุปกรณ์

1.	จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำไร้เชื้อแล้ว	3 จาน
2.	หลอดที่มีนิวเตรียนท์อาการ์ (ปริมาตร 10 มล.) สำหรับเทลงเพลต	6 หลอด
3.	หลอดที่มีสารละลายสเตรปโตมัยซิน 1%	1 หลอด
4.	ท่อนไม้เล็กๆ ขนาด 1/8" X ½" X 2"	1 ท่อน
5.	ปิเปตขนาด 1 มล.	2 อัน
6.	นิวเตรียนท์อาการ์เพลตที่มีสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมล.	1 เพลต
7.	ตะเกียงบุนเสนหรือตะเกียงแอลกอฮอล์	1 ดวง
8.	ห่วงถ่ายเชื้อ	1 อัน
9.	บีกเกอร์ที่มีเอทานอล 95 %	1 บีกเกอร์
10.	สเปรดเดอร์ที่เป็นแท่งแก้ว	1 อัน
11.	*Escherichia coli* ที่เพาะเลี้ยงในนิวเตรียนท์บรอท 6-12 ชั่วโมง	1 หลอด

วิธีปฏิบัติ

1. เตรียมสเตรปโตมัยซินนิวเตรียนท์อาการ์เกรเดียนท์เพลต 2 เพลตดังนี้
   1.1 ทำการหลอมเหลวนิวเตรียนท์อาการ์ที่จะเทและทำให้เย็นลงถึง 50 °C
   1.2 นำท่อนไม้วางใต้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทนิวเตรียนท์อาการ์ที่อยู่ในหลอดหนึ่งลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัว
   1.3 ดึงท่อนไม้ที่วางอยู่ใต้จานอาหารเลี้ยงเชื้อออก
   1.4 ใช้ปิเปต 0.1 มล. ใส่ไปในอาหารวุ้นหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันดีโดยใช้ฝ่ามือหมุนหลอด แล้วเทอาหารวุ้นลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งตอนนี้วางบนโต๊ะในแนวขนานกับโต๊ะ
   1.5 ทำเครื่องหมายใต้จานว่าบริเวณใดมีความเข้มข้นของสเตรปโตมัยซินสูง บริเวณใดมีความเข้มข้นของสเตรปโตมัยซินต่ำ
2. ใช้ปิเปตดูด *E. coli* ที่เพาะเลี้ยง 0.1 มล. ใส่ลงไปบนผิวอาหารสเตรปโตมัยซินนิวเตรียนท์อาการ์เกรเดียนต์เพลตในแต่ละเพลตทั้ง 2 เพลต และในสเตรปโตมัยซินนิวเตรียนท์อาการ์เพลต 1 เพลต
3. ทำให้สเปรดเดอร์ไร้เชื้อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์แล้วนำไปลนไฟผ่านตะเกียงบุนเสนหรือตะเกียงแอลกอฮอล์ ปล่อยให้แท่งแก้วเย็นโดยให้แท่งแก้วแตะอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วในจานก่อนไปสัมผัสกับแบคทีเรีย
4. กระจายเชื้อ *E. coli* ให้ทั่วผิวอาหารโดยใช้แท่งแก้วทั้ง 3 จาน ทำเครื่องหมายแต่ละจาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

5. นำอาหารสเตรปโตมัยซินนิวเตรียนท์อาการ์เกรเดียนต์เพลตที่มี *E. coli* กระจายอยู่ 1 เพลต ไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลต โดยวางจานให้ห่างจากแสงอัลตราไวโอเลต 40 เซนติเมตรเป็นเวลา 3 นาที
6. กลับจานและนำจานทั้งสามไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 4-7 วัน
7. หลังจาก 4-7 วัน ให้ดูโคโลนีที่เกิดขึ้น ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของสเตรปโตมัยซินสูง นับโคโลนีที่ปรากฏซึ่งเป็นสายพันธุ์กลาย (Mutant) ที่ต้านทานสเตรปโตมัยซิน เปรียบเทียบจำนวนสายพันธุ์กลายที่เกิดขึ้นในเพลตทั้ง 3 เพลต ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต
8. เก็บโคโลนีเหล่านั้นในอาหารนิวเตรียนท์อาการ์ผิวเอียง หลอดละ 1 ไอโซเลต เขียนหมายเลขเชื้อให้ชัดเจน และบ่มไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พร้อมด้วยหลอดสายพันธุ์พ่อแม่ที่ไม่ได้เลี้ยงบนอาหารที่มีสเตรปโตมัยซิน
9. ตรวจหาสายพันธุ์ที่ต้านทานสเตรปโตมัยซินเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยนำสายพันธุ์ที่แยกได้แต่ละไอโซเลตรวมทั้งสายพันธุ์พ่อแม่มาเพาะเลี้ยงบนผิวอาหารที่มีสเตรปโตมัยซิน โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อลากเป็นแนวเส้นตรง บ่มจานเพาะเชื้อไว้ที่ 37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง
10. เปรียบเทียบการเติบโตของสายพันธุ์ที่ต้านทานสเตรปโตมัยซินกับสายพันธุ์พ่อแม่ที่เติบโตบนอาหารที่มีสเตรปโตมัยซิน

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม

1. **มีโคโลนีของ *E. coli* จำนวนเท่าใดที่นับได้จากบริเวณที่สเตรปโตมัยซินมีความเข้มข้นสูงของจานเพาะเชื้อที่ผ่านแสง UV ของจานที่ไม่ผ่านแสง UV และของจานที่มีสเตรปโตมัยซินที่ไม่ใช่เกรเดียนท์**

2. **การเติบโตของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์แท้บนอาหารที่มีสเตรปโตมัยซินแตกต่างกันอย่างไร**

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 6 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก *E. coli*

(Total DNA Isolation of *E. coli*)

จากบันทึกข้อความของ Oswald Avery ในปี ค.ศ. 1944 ดังนี้ "เมื่อแอลกอฮอล์มีความเข้มข้นในปริมาตรประมาณ 9/10 ส่วน มันจะแยกสารที่เป็นสายโดยใช้แท่งแก้วคนซึ่งจะติดกับแท่งแก้วคล้ายกับเส้นด้าย ทิ้งความไม่บริสุทธิ์อื่นๆไว้ในลักษณะเป็นตะกอนเม็ดเล็กๆ สารเส้นใยนั้นสามารถถูกทำให้ละลายใหม่ และกระบวนการนั้นเกิดซ้ำหลายๆ ครั้ง สารนี้มีความไวต่อปฏิกิริยา จากการวิเคราะห์เบื้องต้นสารนี้มีความใกล้เคียงที่สุดกับดีเอ็นเอบริสุทธิ์" จากการค้นพบนี้จึงนำมาซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอ การปล่อยดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียทำได้โดยการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียอ่อนตัวลงโดย การย่อยเซลล์โดยใช้ไลโซไซม์ (Lysozyme)ในที่ที่มี EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) และทำให้เซลล์แตก (Lysing cells) ด้วยสารซักฟอก (Detergent) เช่น โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sodium dodecylsulfate = SDS) ตามด้วยการสกัดด้วยฟีนอล (Phenol extraction) เพื่อดึงเอาโปรตีนออก

วัตถุประสงค์ เพื่อสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ของแบคทีเรีย

วัสดุอุปกรณ์
1. LB media (Luria-Bertani Medium) (ส่วนผสมต่อลิตร: *950* ml of deionized H_2O bacto-tryptone 10 *g* bacto-yeast extract 5 g NaCl 10 g)
2. TE pH 7.4 (10 mM Tris.Cl (pH 7.4) 1 mM EDTA (pH 8.0))
3. TEN (TE buffer (10 mM Tris-Cl , 1mM EDTA pH 8.0ที่มี 0.1 N NaOH 0.5 % Sodium dodecyl sulfate)
4. SDS
5. 3 M NaOAc
6. Chloroform
7. Isoamyl alcohol
8. 100 % Ethanol
9. Microcentrifuge tube
10. Centrifuge
11. Pipettman

วิธีปฏิบัติ การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ของแบคทีเรียให้นักศึกษาปฏิบัติดังนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

1. เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้เติบโตในอาหารเหลว 3 มล. 16-24 ชั่วโมง
2. นำเซลล์ 1.5 มล. มาหมุนเหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ไมโครเซนตริฟิวจ์ เพื่อให้เกิดเพลเลตของเซลล์
3. เทส่วนลอยทิ้ง
4. ละลายเซลล์เพลเลต (Resuspend) ใน LB 50 μl
5. เติม 300 μl ของ TENS ผสมโดยใช้ Vortex เป็นเวลา 2-5 วินาที จนกระทั่งเหนียว วางตัวอย่างในน้ำแข็ง
6. เติม 150 μl ของ 3 M โซเดียมแอซิเตต (Sodium acetate) pH 5.2 หรือ 5.5 ผสมโดย Vortex 2-5 วินาที เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี
7. เติมคลอโรฟอร์ม (Chloroform) 300 μl และไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol) 100 μl ผสมอย่างรวดเร็วจนกระทั่งเป็นสีขาว
8. ทำการหมุนเหวี่ยง ที่ 4500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดการแยกชั้น เป็นชั้นคลอโรฟอร์มอยู่ที่ก้นหลอด และชั้นที่เป็นชิ้นส่วนของเซลล์ และชั้นบนสุดเป็นชั้นของน้ำ (Aqueous phase) ที่มี DNA
9. ถ่ายชั้นบนสุดลงในหลอดใหม่
10. เติม 100 % เอทานอล 600 μl แช่ในน้ำแข็ง หรือเก็บไว้ที่ –20 °C เป็นเวลา 5 นาที
11. หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เท Supernatant ทิ้ง อาจเห็นเพลเลต (Pellet) สีขาวติดอยู่ที่ก้นหลอด
12. ล้าง DNA ด้วย 70 % EtOH 2 ครั้ง โดยใส่ 70 % EtOH 500 μl และทำการหมุนเหวี่ยงที่ 10000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
13. ปล่อยให้เพลเลต (Pellet) แห้งด้วยอากาศ เป็นเวลา 20 นาที ถึง 30 นาที
14. ละลาย DNA เพลเลตใน TE 40 μl
15. วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทำการเจือจาง DNA 30-50 เท่า และใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 260 nm ความเข้มข้นของดีเอ็นเอคำนวณได้จากสูตร

    ความเข้มข้นดีเอ็นเอ μg/ml = OD_{260} X dilution factor X 50 /1000

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม ดีเอ็นเอละลายในแอลกอฮอล์หรือไม่ ดีเอ็นเอแยกออกจากสารอื่นได้อย่างไร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 7 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*

จากบันทึกข้อความของ Oswald Avery ในปี ค.ศ. 1944 ดังนี้ "เมื่อแอลกอฮอล์มีความเข้มข้นในปริมาตรประมาณ 9/10 ส่วน มันจะแยกสารที่เป็นสายโดยใช้แท่งแก้วคนซึ่งจะติดกับแท่งแก้วคล้ายกับเส้นด้ายบนแท่งแก้ว ทิ้งความไม่บริสุทธิ์อื่นๆไว้ในลักษณะเป็นตะกอนเม็ดเล็กๆ สารเส้นใยนั้นถูกทำให้ละลายใหม่ และกระบวนการนั้นเกิดซ้ำหลายๆ ครั้ง สารนี้มีความไวต่อปฏิกิริยา จากการวิเคราะห์เบื้องต้นสารนี้มีความใกล้เคียงที่สุดกับดีเอ็นเอบริสุทธิ์" จากการค้นพบนี้จึงนำมาซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอ การปล่อยดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียทำได้โดยการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียอ่อนตัวลงโดย การย่อยเซลล์โดยใช้ไลโซไซม์ (Lysozyme)ในที่ที่มี EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) เพื่อทำการสลายผนังเซลล์ (Break down cell wall) และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane) และทำให้เซลล์แตก (Lysing cells) ด้วยสารซักฟอก (Detergent) เช่น โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sodium dodecylsulfate =SDS) และต้มหรือใช้ด่าง (Boiling or treatment with alkali) การใช้ด่างจะขัดขวางการจับคู่ของเบส ทำให้ดีเอ็นเอที่เป็นโครโมโซมที่เป็นเส้น (Linear chromosomal DNA) เสียสภาพส่วน พลาสมิดดีเอ็นเอที่เป็นวงปิดไม่สามารถแยกออกจากกัน เพราะโครงสร้างที่บิดพันกัน ทำให้เมื่อกลับสู่สภาวะปกติ โมเลกุลของพลาสมิดกลับสู่รูปแบบเดิมไม่บกพร่อง แล้วจึงตามด้วยการสกัดด้วยฟีนอล (Phenol extraction) เพื่อดึงเอาโปรตีนออก

พลาสมิด (Plasmid) เป็นสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมที่ทำการถ่ายแบบอย่างอิสระจากโครโมโซมของเซลล์ พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่ ส่วนใหญ่เป็นวง พลาสมิดมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 1 กิโลเบส-มากกว่า 1000 กิโลเบส พลาสมิดมีจุดที่เป็นต้นกำเนิดของการถ่ายแบบ (Origin of replication = *ori*) การถ่ายแบบอาจดำเนินไปในทิศทางเดียวหรือ 2 ทิศทาง ที่เป็นวง เอนไซม์ในการถ่ายแบบเป็นเอนไซม์ที่เซลล์ใช้อยู่ปกติในการถ่ายแบบ พลาสมิดที่อยู่ในเซลล์มีต่างชนิดกัน พลาสมิดบางชนิดมีจำนวนชุด (Copy number) น้อยเพียง 1-3 ชุดเรียก Low copy number plasmids บางชนิดมีจำนวนชุดมากเรียก High copy number plasmids มียีนควบคุมการถ่ายแบบของดีเอ็นเอ *inc* ทำหน้าที่ควบคุมพลาสมิดที่แตกต่างกัน 2 ชนิดที่จะสามารถทำการถ่ายแบบในเซลล์เดียวกัน เมื่อมีการถ่ายพลาสมิดเข้าไปในเซลล์ที่มี พลาสมิดอีกชนิดหนึ่งพลาสมิดที่ถ่ายเข้าไปใหม่อาจไม่สามารถอยู่รอดได้หรือสูญหายไปในระหว่างการถ่ายแบบเรียกพลาสมิดทั้งสองนี้ว่า ไม่สามารถเข้ากันได้ (Incompatible = *inc*) ถ้าพลาสมิดทั้งสองสามารถถ่ายแบบในเซลล์เดียวกันได้เรียก เข้ากันได้ (Compatible) พลาสมิดสามารถถ่ายทอดจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งโดยการคอนจูเกชัน (conjugation) แต่พลาสมิดบางชนิดเท่านั้นไม่ใช่ทุกชนิดสามารถถ่ายทอดไปได้โดยการคอนจูเกชัน การถ่ายทอดถูกควบคุมโดย *tra* region ซึ่งเป็นชุดของยีนอยู่ในพลาสมิด การมีบริเวณ *tra* ในพลาสมิดส่งผลที่สำคัญต่อการผสมผสานพลาสมิดเข้าไปในโครโมโซม พลาสมิดจึงสามารถเคลื่อนย้าย (Mobilize) ส่งผ่านดีเอ็นเอของโครโมโซมจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่ง

Pibulsongkram Rajabhat University

สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถขนส่งดีเอ็นเอของโครโมโซมในปริมาณมากในระหว่างคอนจูเกชัน เรียก *Hfr* (High frequency of recombination) การค้นพบคอนจูเกชันเนื่องจาก F พลาสมิด ที่สามารถเคลื่อนย้ายจีนของโครโมโซม F พลาสมิดเป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นวงมีขนาดประมาณ 100 คู่เบส ในบริเวณหนึ่งของพลาสมิดประกอบด้วยจีนที่ควบคุมการถ่ายแบบของพลาสมิดได้แก่ (*Inc* และ *ori* S) และมี Transposible elements ซึ่งทำหน้าที่เป็น Episomes คือความสามารถที่จะเข้าไปผสมผสานกับโครโมโซมของ เซลล์ Host และมีบริเวณ *tra* ซึ่งเป็นจีนที่ยอมให้มีการถ่ายทอดจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่ง พลาสมิดจะมีจีนที่ไม่จำเป็นต่อ Host แต่การมีพลาสมิดในเซลล์มีผลต่อฟีโนไทป์ของเซลล์

เนื่องจากความสำคัญของการใช้พลาสมิดเป็นเครื่องมือในการนำพาจีนแปลกปลอม จึงจำเป็นต้องมีวิธีการในการทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะพลาสมิดดีเอ็นเอ เทคนิคที่ใช้ในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ในปริมาณมากๆ และรวดเร็วคือ พลาสมิดมินิเพรป (Plasmid miniprep) พลาสมิดมินิเพรปวิธีหนึ่งคือ Alkali-SDS denaturation method วิธีการนี้พัฒนาขึ้นโดย H. C. Birnboim และ J. Doly (1979) วิธีการนี้ใช้ไลโซไซม์ทำให้ผนังเซลล์อ่อน และ SDS ทำให้ผนังเซลล์แตก สารละลาย NaOH ทำให้ดีเอ็นเอที่เป็นโครโมโซมเสียสภาพ

วัตถุประสงค์ เพื่อสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* โดย พลาสมิดมินิเพรป

วัสดุอุปกรณ์
1. LB media (Luria-Bertani Medium) (ส่วนผสมต่อลิตร :950 ml of deionized H_2O bacto-tryptone 10 *g*, bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g)
2. TE pH 7.4 (10 mM Tris.Cl (pH 7.4) 1 mM EDTA (pH 8.0)
3. TEN (TE buffer (10 mM Tris-Cl , 1mM EDTA pH 8.0 ที่มี 0.1 N NaOH 0.5 % Sodium dodecyl sulfate)
4. 3 M Sodium acetate
5. 100 % Ethanol
6. Microcentrifuge tube
7. Centrifuge
8. Pipettman

วิธีปฏิบัติ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้เติบโตในอาหารเหลว 3 มล. 16-24 ชั่วโมง
2. นำเซลล์ 1.5 มล. มาหมุนเหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ไมโครเซนตริฟิวจ์ เพื่อให้เกิดเพลเลตของเซลล์
3. เทส่วนลอยทิ้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

4. ละลายเซลล์เพลเลต (Resuspend) ใน LB 50 μl
5. เติม 300 μl ของ TENS ผสมโดยใช้ Vortex เป็นเวลา 2-5 วินาที จนกระทั่งเหนียว วางตัวอย่างในน้ำแข็ง
6. เติม 150 μl ของ 3 M โซเดียมแอซิเตต (Sodium Acetate) pH 5.2 หรือ 5.5 ผสมโดย Vortex 2-5 วินาที เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี
7. หมุนเหวี่ยงใน ไมโครเซนตริฟิวจ์ 2 นาทีเพื่อทำให้ชิ้นส่วนของเซลล์และโครโมโซมอลดีเอ็นเอตกตะกอนเป็นเพลเลต
8. ถ่ายส่วนลอยลงในหลอดใหม่ๆ ผสมให้เข้ากันดีด้วย 0.9 มล. ของ 100 % เอทานอล ซึ่งทำให้เย็นลงที่ -20 °C ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
9. หมุนเหวี่ยงใน ไมโครเซนตริฟิวจ์ 15 นาที เพื่อเพลเลต DNA และ RNA (ให้สังเกต เพลเลตสีขาว)
10. ทิ้งส่วนลอย ล้างเพลเลตด้วย 70 % หรือ 80 % เอทานอล และทำเพลเลตให้แห้งภายใต้สุญญากาศ เป็นเวลา 2-3 นาที
11. ละลายเพลเลตใน 50 μl 10 mM Tris pH 8.0
12. วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทำการเจือจาง DNA 30-50 เท่า และใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 260 nm ความเข้มข้นของดีเอ็นเอคำนวณได้จากสูตร

    ความเข้มข้นดีเอ็นเอ μg/ml = OD, X dilution factor X 50 /1000

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม เพราะเหตุใดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจึงไม่ปนอยู่กับพลาสมิดดีเอ็นเอในการสกัดด้วยวิธีนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 8 อิเล็กโตรโฟริซิส (Electrophoresis) ของดีเอ็นเอ

การศึกษาลักษณะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอต้องอาศัยวิธีการแยกง่ายๆ เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ วิธีการเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (Gel electrophoresis) เป็นเทคนิควิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก ระบุชนิด และทำให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ตามขนาดของโมเลกุลเป็นสำคัญ เทคนิคนี้เป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และสามารถแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ออกจากกันโดยไม่สามารถใช้วิธีอื่นในการแยก รูปแบบของเจลที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ เอกาโรสเจล (Agarose gel) มีอำนาจในการจำแนกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในช่วงที่สูง ปกติใช้แยกชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสถึง 20 กิโลเบส และแม้ว่าชิ้นส่วนที่ใหญ่กว่าจาก 10 กิโลเบสถึงมากกว่า 200 กิโลเบส เจลอิเล็กโตรโฟริซิส ที่มีสนามไฟฟ้าสลับก็สามารถใช้แยกได้ เอกาโรสเจลเป็นพอลิเมอร์ที่ได้มาจากวัชพืชน้ำ (Seaweed) เป็นองค์ประกอบของ Agar Agar ซึ่งเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ของครูดเอการ์ (Crude agar) มันเป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์และแตกต่างจาก Agar ในแง่ของซัลเฟชั่นของพอลิแซ็กคาไรด์ (Sulfation of the polysaccharide) การทำให้เกิดเจลทำได้โดยทำให้เอกาโรสหลอมในบัฟเฟอร์ เทลงในแม่แบบ (Gel cast) ที่มีหวีที่ทำให้เกิดเป็นบ่อ (Well) และทำให้เป็นเจลโดยทำให้เย็นลง เปอร์เซ็นต์ของเอกาโรสเป็นตัวควบคุมการแยกขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ในงานทั่วๆ ไปปกติใช้ 0.7% -1 % เอกาโรส เจล การย้อมดีเอ็นเอปกติใช้ เอทิเดียม โบรไมด์ (Ethidium bromide) สีฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งจะแทรกเข้าไประหว่างเบสของดีเอ็นเอ สารนี้เป็นสารก่อการกลาย (Mutagen) และก่อมะเร็ง (Carcinogen) เพราะมันแทรกเข้าไปในระหว่างเบสของดีเอ็นเอและทำการถ่ายแบบและก่อให้เกิดการกลายโดยการสลับกรอบ (Frameshift mutation) เมื่อทำให้เกิดสนามไฟฟ้าขึ้นตลอดเจล ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบที่ pH เป็นกลางเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (Anode) อัตราการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของเอกาโรส โครงรูปของดีเอ็นเอ องค์ประกอบของเบส อุณหภูมิ การมี Intercalating dyes สิ่งที่ประกอบของอิเล็กโตรโฟริซิสบัฟเฟอร์

วัตถุประสงค์ เพื่อทำการศึกษาโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส

วัสดุอุปกรณ์

1. เอกาโรส (agarose)
2. 10 X TBE buffer
3. Gel Apparatus
4. Flask
5. Microwave oven
6. DNA sample
7. Loading buffer

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

8. Pipettes
9. ถุงมือ (Gloves)

วิธีปฏิบัติ

1. จัดตั้งเครื่อง Gel electrophoresis เตรียม gel caster สำหรับเทเจล
2. สำหรับ 0.7 % Agarose gel ชั่ง 0.49 กรัม agarose
2. เติม 0.5 X TBE 70 มล.
3. ใส่ อะการ์โรสลงไปในบัฟเฟอร์ และหมุน
4. นำไปทำให้เจลหลอมละลายโดยใส่ใน ไมโครเวฟ เป็นเวลา 1-3 นาที และเฝ้ามองมิให้ล้น
5. ปล่อยให้เย็นสักพัก และ เทลงใน Gel caster ให้หนาประมาณ 0.5 ซม.
6. ทิ้งไว้ 30-45 นาทีให้กลายเป็นเจล
7. ค่อยๆ ดึงหวีออกโดยไม่ทำให้ Well แตก
8. วางเจลลงใน แทงค์ และเทบัฟเฟอร์ 0.5 X TBE ลงให้ท่วมสูงเหนือผิวเจลประมาณ 2-3 ซม.
9. ต่อขั้วไฟฟ้า โดยต่อขั้วลบ สีดำ เข้ากับที่ต้นกำเนิดของเจล และต่อขั้วบวก สีแดงเข้ากับที่ด้านตรงข้ามของเครื่อง
10. ตรวจดูกระแสไฟที่ 70-100 โวลต์ 35-50 ma
11. เตรียมตัวอย่าง โดยใช้ Loading buffer 3-5 μl ในตัวอย่าง 17-15 μl
12. Load ตัวอย่างลงใน well ด้วย Micropipetter
13. ให้ตรวจสอบความเรียบร้อยของเครื่อง และ Run gel จนกระทั่งสี Bromophenol blue ถึงก้นเจล ประมาณ 1-2 ชั่วโมง
14. ให้ตรวจดูดีเอ็นเอที่เจล โดยย้อมสีด้วย 0.05 % เมทีลีนบลู (Methylene blue) เป็นเวลา 30 นาที และล้างสีที่มากเกินพอออกด้วย (Destain) ด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งเห็น DNA band

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม

เพราะเหตุใดดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน 2 ขนาดจึงสามารถแยกออกจากกันโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 9 การแปลงหรือทรานส์ฟอร์เมชัน (Transformation)

การแปลง (Transformation) เป็นวิธีการหนึ่งในการถ่ายโอนจีนในแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการรับเอาดีเอ็นเอที่อยู่อิสระเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย ผู้ที่นำคำว่าการแปลงเข้ามาใช้เป็นครั้งแรกคือ กริฟฟิท (Griffith) ในปี ค.ศ. 1928 เขานำคำนี้มาใช้เมื่อเขาได้สังเกตว่า สายพันธุ์ *Diplococcus pneumoniae* ที่ไม่ทำให้เกิดโรคปอดบวม เกิดการแปลง (Transformation) เมื่อไปสัมผัสกับเซลล์ที่ทำให้เกิดโรคที่ตายแล้ว ซึ่งต่อมาจึงทราบว่าดีเอ็นเอคือตัวการในการแปลง แบคทีเรียที่สามารถรับเอาและสอดใส่ดีเอ็นเออิสระเข้าไปในจีโนมของมันเรียกคอมพีเทนท์ (Competent) สายพันธุ์แบคทีเรียบางสายพันธุ์มีความสามารถในการคอมพีเทนท์ที่สูงมากในระหว่างระยะหนึ่งหรือหลายระยะของการเติบโตภายใต้สภาวะของห้องปฏิบัติการปกติ ขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ ต้องมีการถูกกระทำ (Treatments) เพื่อให้ลักษณะคอมพีเทนท์กลับคืนมา แบคทีเรียที่สามารถมีการแปลงได้อย่างสูงได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* *Haemophilus influenzae* (Alexander and Leidy 1951) *Bacillus subtilis* (Spizizen 1958) คอมพีเทนท์ในแบคทีเรียนี้เป็นสภาวะทางสรีระชั่วคราวในระหว่างวัฏจักรการเติบโต

กระบวนการแปลงของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Streptococcus, Bacillus* สามารถแบ่งได้เป็นขั้นตอนดังนี้

1. การเกิดคอมพีเทนท์เนื่องจากการหลั่งโปรตีนเล็กๆ เรียกคอมพีเทนท์แฟกเตอร์ (Competent factor)
2. การเชื่อมของโมเลกุลดีเอ็นเอสายคู่เข้ากับแบคทีเรีย
3. การรับเอาโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยว
4. การเคลือบ (Coating) โมเลกุลสายเดี่ยวด้วยโปรตีนจำเพาะที่ป้องกันดีเอ็นเอจากนิวคลีเอส (Nucleases)
5. การผสมผสานโดยการรีคอมบิเนชันของสายทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอเข้ากับโครโมโซมผู้รับ

a. การถ่ายแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอผสมผสาน (Integrated DNA segments) และการแยกแอลลีลของผู้รับและผู้ให้ในแบคทีเรียลูกหลานเพื่อให้เกิด Clones ที่มีการแปลงด้วยฟีโนไทป์ใหม่

ในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Haemophilus* ไม่มีการสร้าง Competent factor และกระบวนการเชื่อมและรับเอาดีเอ็นเอแตกต่างจากแกรมบวก และเฉพาะโฮโมโลกัสดีเอ็นเอเท่านั้นที่เข้ารวมและรับเอาดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปโมเลกุลคู่ที่สมบูรณ์ครบถ้วน *E. coli* ก็เช่นเดียวกัน ไม่เกิดการแปลงอย่างมีประสิทธิภาพถ้าปราศจากการถูกกระทำเป็นพิเศษ การเกิดคอมพีเทนท์ต้องถูกเหนี่ยวนำโดยกระบวนการทดลองพิเศษ ซึ่งเกิดขึ้นโดยการนำผนังเซลล์ออก และเกิดเป็น Spheroplasts อาจทำให้ส่วนห่อหุ้มเซลล์รับเอา ดีเอ็นเอโดยการ Treatment ด้วย Ca^{2+} และใช้ Heat shock (Mandel and Higa 1970) ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันชัดถึงการที่แคลเซียมช่วยส่งเสริมการเกิดคอมพีเทนท์ การแปลง หรือทรานส์ฟอร์เมชันของ *E. coli* มีความสำคัญสำหรับเทคโนโลยีของการโคลนนิง เนื่องจากคอมพีเทนท์เซลล์สามารถถูกทรานส์ฟอร์มเรพลิคอนเล็กๆ ต่างๆ ที่ใช้ในการสร้างรีคอมบิเนนต์ดีเอ็นเอโมเลกุล การตรวจโคลนจีนที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

วัตถุประสงค์ เพื่อทำการทรานส์ฟอร์เมชัน *E. coli* JM 109 ด้วยพลาสมิด pUC 118 (Amp^r)

วัสดุอุปกรณ์

1. พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC 118 (Amp^r)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB
3. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 μg/ml
4. สารละลาย 0.1 M $MgCl_2$
5. สารละลาย 0.1 M $CaCl_2$
6. อ่างใส่น้ำแข็ง
7. น้ำแข็ง
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Microcentrifuge)
9. หลอดหมุนเหวี่ยง (Centrifuge tube) ที่ทำให้ไร้เชื้อ
10. เครื่องอังน้ำ ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C
11. *E. coli* JM 109 (*rec*A1 *sup* E44 *end*A1 *gsd/r*7 *gyr*A96 *rel*A *thi* (*lac-prom*)F' [*tra*D36 *pro*AB+ *lac*Iq *lacZ* M15]

การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ (Preparation of Competent Cells)

1. ทำการเพาะเซลล์ (Inoculum) *E. coli* JM 109 ใน LB 2 มล. บ่มให้เติบโตข้ามคืนที่ 37 °C ถ่ายเชื้อที่เติบโตข้ามคืน 1 มล. ลงในอาหาร LB *50* ml และปล่อยให้เติบโต โดยทำการหมุนเหวี่ยงที่ 37 °C จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 550 nm ประมาณ *0.5*
2. ทำเซลล์ให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยหมุนอย่างเร็วในน้ำแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที
3 หมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
4. ทำให้ผลึกเซลล์เป็นสารแขวนลอย (Resuspend) ใหม่โดยใช้ความนุ่มนวลใน 10 มล. ของ 0.1 M $MgCl_2$ ที่เย็นซึ่งแช่น้ำแข็ง หมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. ทำให้ผลึกเซลล์เป็นสารแขวนลอย (Resuspend) ใหม่โดยใช้ความนุ่มนวลใน 10 มล. ของ 0.1 M $CaCl_2$ บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
6. หมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำให้ผลึกเซลล์เป็นสารแขวนลอยใน 2.5 มล. ของ 0.1 M $CaCl_2$ + 350 μl Glycerol
7. ถ่าย Aliquot 500 μl ลงใน Eppendorf tubes อย่างรวดเร็ว แช่แข็งใน น้ำแข็งแห้งเอทานอล และเก็บไว้ที่ –70 °C
8. ใช้คอมพีเทนท์เซลล์ในการทรานส์ฟอร์เมชัน 200 μl

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

การแปลงของพลาสมิดดีเอ็นเอ (วิธีการ $CaCl_2$)

1. ในหลอด 3 หลอดที่ได้ทำเครื่องหมาย A, B, C และแช่ในน้ำแข็ง ให้ผสมสิ่งต่างๆ ดังนี้

   หลอด A (ใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 μg ของดีเอ็นเอสำหรับการทรานส์ฟอร์เมชัน แต่ละกลุ่มให้ใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเดียว) __μg ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC118 เข้ากับ 0.2 มล. คอมพี เทนท์ เซลล์ที่เย็น

   หลอด B (ใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 0.25 0.5 1.0 5.0 μg ของดีเอ็นเอสำหรับการทรานส์ฟอร์เมชัน แต่ละกลุ่มให้ใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเดียว) __μg ของพลาสมิดดีเอ็นเอ เข้ากับ 0.2 มล 50 mM $CaCl_2$

   หลอด C ---- μl ของTE buffer เข้ากับ 0.2 มล ของ คอมพลีเทนท์เซลล์

   หลอด B และ C เป็นหลอดควบคุมเพื่อแสดงถึง ความไร้เชื้อ (Sterility) ของสารทำปฏิกิริยาต่างๆ (Reagents)

2. แช่หลอดทั้งหมดไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
3. นำหลอดทั้งสามแช่ในเครื่องอังน้ำ (Water bath) ที่ 42 °C เป็นเวลา 2 นาที การทำให้สะดุ้งด้วยความร้อน (Heat shock) จะช่วยให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์
4. เติม LB 1 มล. ลงในแต่ละหลอด และ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที
5. กระจายเชื้อโดยตรงลงบน LB agar plate ที่มี Ampicilin เพื่อคัดเลือก ทรานส์ฟอร์แมนต์ บ่มเพลตคว่ำลงที่ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน
6. นับทรานส์ฟอร์แมนต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม ทรานส์ฟอร์แมนต์มีพันธุกรรมเป็นอย่างไร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 10 การคอนจูเกชัน (Conjugation)

การคอนจูเกชันเป็นการถ่ายทอดสารพันธุกรรมในทิศทางเดียวโดยอาศัยการสัมผัสระหว่างเซลล์ (รูปที่ 10.1) โดยแบคทีเรียเซลล์หนึ่งถ่ายสารพันธุกรรมไปให้กับแบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่ง แบคทีเรียที่เป็นเซลล์ที่ถ่ายทอดสารพันธุกรรมให้กับอีกเซลล์หนึ่งเรียกผู้ให้ (Doner) เพราะมี F พลาสมิด เรียกเซลล์ผู้ให้ว่าเป็น F^+ เซลล์ ส่วนเซลล์ที่เป็นผู้รับสารพันธุกรรมจากอีกเซลล์หนึ่งเรียก ผู้รับ (Recipient) ซึ่งไม่มี F พลาสมิด เรียก F^- เซลล์ F พลาสมิด เป็นดีเอ็นเอพลาสมิดที่เป็นวงขนาดเล็ก (94.5 kb) ซึ่งสามารถถ่ายแบบ (Replication) อัตโนมัติใน เซลล์หรือเข้าไปผสมผสานกับโครโมโซมของโฮสต์ F พิไล (F pili) ช่วยทำให้เกิดการสัมผัสระหว่างเซลล์กับเซลล์ สายเดี่ยวของ F ดีเอ็นเอจะถูกถ่ายไปให้เซลล์ผู้รับโดยผ่านทางรูที่ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์และสายใหม่จะถูกสร้างขึ้นโดยระบบถ่ายแบบของเซลล์ผู้รับ ถ้ามีการถ่ายเทพลาสมิดทั้งพลาสมิดเข้าไปในเซลล์ผู้รับเรียกเซลล์นี้ว่า ทรานส์คอนจูแกนท์ (Transconjugant) ส่วนของโครโมโซมผู้ให้เพียงส่วนเดียวเท่านั้นที่ส่งผ่านไปสู่ผู้รับ ดีเอ็นเอที่ผู้รับได้รับมาจะถูกนำเข้าไปผสมผสานกับโครโมโซมที่เป็นวงที่มีอยู่ 1 โครโมโซมของผู้รับ เรียกเซลล์ที่มีสารพันธุกรรมเข้าไปผสมผสานกับโครโมโซมนี้ว่า HFr (High frequency of recombination)

วัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกหาทรานส์คอนจูแกนท์

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Salts + Glucose + Thr+Leu +Thi + Pro + Met (Selective media สำหรับ *E. coli* 153 (RP4) *E. coli* HB101 (pKT210) Donor stains)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Salts + Glucose + Thr+Leu +Thi (Selective media สำหรับ *E. coli* C 600 F^- Recipient stains)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Salts + Glucose + Thr+Leu +Thi + Tc^{10} (Selective media สำหรับ Transconjugant ที่เกิดจาก *E. coli* 553 (RP4) Donor stains)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Salts + Glucose + Thr+Leu +Thi + Cm^{30}(Selective media สำหรับ Transconjugant ที่เกิดจาก *E. coli* HB 101 (pKT210) Donor stains)
5. เครื่องอังน้ำแบบเขย่า (Shaking water bath)
6. ไมโครปิเปตที่ผ่านการทำไร้เชื้อ
7. NaCl 0.85% ที่ผ่านการทำไร้เชื้อ
8. *E. coli* 553 (RP4) , *E. coli* HB 101 (pKT210), *E. coli* C 600

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

รูปที่ 10.1 การคอนจูเกชัน (Miller, 1992)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. เพาะเชื้อ *E. coli* C 600 ใน LB 5 มล. , *E. coli* J53 (RP4) ใน LB 5 มล. + Tetracyclin 10 μg/ml , *E. coli* HB101 (pKT210) ใน LB 5 มล. + Chloramphenicol 25 μg/ml
2. บ่มเชื้อใน เครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15-18 ชั่วโมง
3. ทำการคอนจูเกชัน โดยหยดสายพันธุ์ผู้ให้ (*E. coli* J53 (RP4) หรือ *E. coli* HB101 (pKT210) 0.2 มล. ลงไปบนหยดสายพันธุ์ผู้รับ (*E. coli* C 600) 0.2 มล. บน Selective media สำหรับ Transconjugants ผสมสายพันธุ์ทั้งสอง โดยพยายามอย่าให้กระจายวงกว้าง และปล่อยทิ้งไว้บน Selective media

4. ทำการควบคุม Negative control โดยหยด LB 0.4 มล. และ เชื้อแต่ละสายพันธุ์ 0.4 มล. ลงบน Selective media
5. บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. กระจายเชื้อ (Spread plate) บนอาหาร Selective media สำหรับ Transconjugants แต่ละชนิด
7. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน
8. เปรียบเทียบการเติบโตของ Transconjugants

บันทึกผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

คำถาม ทรานส์คอนจูแกนต์มีพันธุกรรมเป็นอย่างไร

ภาคผนวก ข

วิธีคำนวณประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 1

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D
1	9.0	10.7	12.0	1.7	2.89	27	8.0	14.0	15.0	6.0	36.0
2	10.0	12.3	10.9	2.3	5.29	28	9.0	13.6	9.0	4.6	21.2
3	10.0	12.7	12.0	2.7	7.29	29	7.5	12.0	10.1	4.5	20.3
4	9.5	12.3	6.8	2.8	7.84	30	8.0	11.3	10.9	3.3	10.9
5	9.0	10.3	9.4	1.3	1.69	31	9.0	11.0	11.3	2.0	4.0
6	9.5	11.0	12.0	1.5	2.25	32	10.5	12.3	12.4	1.8	3.2
7	9.5	12.7	12.8	3.2	10.24	33	10.0	14.0	14.6	4.0	16.0
8	9.5	8.7	6.0	-0.8	0.64	34	10.0	7.0	10.1	-3.0	9.0
9	10.0	10.7	9.4	0.7	0.49	35	8.5	11.3	13.1	2.8	7.8
10	7.5	13.0	7.1	5.5	30.25	36	10.0	12.0	12.4	2.0	4.0
11	8.0	13.3	11.6	5.3	28.09	37	8.0	14.0	11.3	6.0	36.0
12	9.5	11.7	12.8	2.2	4.84	38	7.5	10.0	10.2	2.5	6.3
13	4.5	11.7	5.3	7.2	51.84	39	6.0	12.3	9.4	6.3	39.7
14	8.5	12.7	13.1	4.2	17.64	รวม	330	543	397.9	123	574.6
15	8.5	13.0	7.1	4.5	20.25						
16	7.0	10.7	6.0	3.7	13.69						
17	9.5	10.0	10.5	0.5	0.25						
18	6.0	12.7	11.6	6.7	44.89						
19	8.0	7.3	10.1	-0.7	0.49						
20	8.5	11.3	10.1	2.8	7.84						
21	9.0	13.0	12.8	4.0	16						
22	8.5	9.7	9.4	1.2	1.44						
23	4.5	9.7	10.9	5.2	27.04						
24	9.0	12.3	6.8	3.3	10.89						
25	8.0	14.0	5.6	6.0	36						
26	7.5	10.7	6.0	3.2	10.24						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{330}{39} = 8.46$$

$$\overline{X}_{\text{ล}} = \frac{543}{39} = 13.92$$

$$\overline{X}_{\text{ฝ}} = \frac{397.9}{39} = 10.2$$

$$E_1 = \frac{10.2}{15} \times 100 = 68$$

$$E_2 = \frac{13.92}{15} \times 100 = 92.8$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \frac{68}{92.8} = 0.73$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \frac{13.92 - 8.46}{15} \times 100 = 36.4$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N\sum D^2 - (\sum D)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{123}{\sqrt{\frac{(39 \times 574.6) - (123)^2}{39 - 1}}}$$

$$t = 8.89$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 2

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D
1	9.0	12.3	12.4	3.3	10.89
2	9.0	10.7	9.0	1.7	2.89
3	9.5	10.3	12.0	0.8	0.64
4	6.0	12.0	7.9	6.0	36
5	5.5	10.3	7.5	4.8	23.04
6	8.5	11.0	8.6	2.5	6.25
7	9.0	12.3	13.1	3.3	10.89
8	8.0	13.3	6.0	5.3	28.09
9	8.5	11.0	11.6	2.5	6.25
10	7.5	13.3	6.0	5.8	33.64
11	8.0	13.0	10.3	5.0	25
12	9.0	13.3	8.3	4.3	18.49
13	6.0	11.0	7.9	5.0	25
14	7.0	13.3	13.5	6.3	39.69
15	9.0	11.0	11.6	2.0	4
16	7.5	11.7	6.0	4.2	17.64
17	7.5	10.3	7.1	2.8	7.84
18	9.0	11.3	11.6	2.3	5.29
19	8.0	8.7	10.1	0.7	0.49
20	7.0	10.3	12.8	3.3	10.89
21	7.5	12.7	13.1	5.2	27.04
22	7.0	11.3	7.1	4.3	18.49
23	5.5	6.7	9.4	1.2	1.44
24	7.5	13.0	11.3	5.5	30.25
25	6.0	11.7	7.5	5.7	32.49
26	7.0	13.3	6.0	6.3	39.69
27	8.0	14.7	12.8	6.7	44.9
28	8.5	13.3	12.0	4.8	23.0
29	13.0	10.7	12.0	-2.3	5.3
30	6.5	8.0	10.1	1.5	2.3
31	6.5	13.7	11.3	7.2	51.8
32	9.5	14.0	13.9	4.5	20.3
33	7.0	12.7	9.8	5.7	32.5
34	7.0	10.0	10.1	3.0	9.0
35	7.5	10.7	10.9	3.2	10.2
36	7.0	12.7	13.5	5.7	32.5
37	6.5	13.0	10.5	6.5	42.3
38	9.0	11.3	10.1	2.3	5.3
39	8.5	12.3	12.4	3.8	14.4
รวม	303.5	456.2	397.1	152.7	756.1

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{303.5}{39} = 7.78$$

$$\overline{X}_{\text{ห}} = \frac{456.2}{39} = 11.70$$

$$\overline{X}_{\text{บ}} = \frac{397.1}{39} = 10.18$$

$$E_1 = \frac{10.8}{15} \times 100 = 67.9$$

$$E_2 = \frac{11.70}{15} \times 100 = 78$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \frac{67.9}{78} = 0.87$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \frac{11.70 - 7.78}{15} \times 100 = 26.13$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N\sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{152.7}{\sqrt{\frac{(39 \times 756.1) - (152.7)^2}{39 - 1}}}$$

$$t = 11.98$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 3

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D
1	7.0	9.0	11.3	2.0	4.0	27	6.0	12.7	9.8	6.7	44.9
2	8.5	11.0	8.6	2.5	6.25	28	8.5	11.3	10.5	2.8	7.8
3	9.0	11.3	7.9	2.3	5.29	29	7.5	11.7	9.4	4.2	17.6
4	8.5	12.3	14.6	3.8	14.44	30	6.0	8.7	9.4	2.7	7.3
5	5.5	10.3	8.3	4.8	23.04	31	8.5	12.0	13.1	3.5	12.3
6	8.0	10.7	6.0	2.7	7.29	32	6.5	14.0	13.5	7.5	56.3
7	7.5	11.0	9.8	3.5	12.25	33	10.0	12.7	11.6	2.7	7.3
8	6.0	11.0	10.9	5.0	25.0	34	6.5	6.7	10.1	0.2	0.0
9	7.0	13.0	12.4	6.0	36	35	6.5	11.7	11.3	5.2	27.0
10	7.5	11.0	10.9	3.5	12.25	36	8.5	12.0	10.9	3.5	12.3
11	6.5	12.3	13.1	5.8	33.64	37	8.0	12.3	12.0	4.3	18.5
12	8.5	10.3	13.1	1.8	3.24	38	9.5	10.3	12.0	0.8	0.6
13	5.0	10.0	11.3	5.0	25.0	39	7.5	12.0	9.0	4.5	20.3
14	7.5	13.7	13.5	6.2	38.44	รวม	290.5	430.9	415.8	140.4	631.1
15	8.0	11.7	11.6	3.7	13.69						
16	7.5	9.7	6.0	2.2	4.84						
17	9.0	9.7	9.8	0.7	0.49						
18	8.5	11.7	12.0	3.2	10.24						
19	7.0	7.0	9.0	0.0	0.0						
20	8.0	11.7	10.1	3.7	13.69						
21	7.5	11.7	12.8	4.2	17.64						
22	5.5	10.3	8.6	4.8	23.04						
23	7.5	7.0	10.1	0.0	0.0						
24	7.0	12.0	10.5	5.0	25.0						
25	7.0	11.7	7.1	4.7	22.09						
26	7.0	11.7	13.9	4.7	22.09						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{290.5}{39} = 4.74$$

$$\overline{X}_{\text{ห}} = \frac{430.9}{39} = 11.05$$

$$\overline{X}_{\text{ฝ}} = \frac{415.8}{39} = 10.66$$

$$E_1 = \frac{10.66}{15} \times 100 = 71.07$$

$$E_2 = \frac{11.05}{15} \times 100 = 73.67$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \frac{71.07}{73.67} = 0.96$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \frac{11.05 - 4.74}{15} \times 100 = 42.07$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N\sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{140.4}{\sqrt{\frac{(39 \times 631.1) - (140.4)^2}{39-1}}}$$

$$t = 12.32$$

ปฏิบัติการที่ 4

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D
1	8.0	8.3	10.1	0.3	0.09	27	9.5	10.7	7.5	1.2	1.4
2	6.5	11.0	8.7	4.5	20.25	28	7.5	12.0	10.9	4.5	20.3
3	6.5	11.7	7.9	5.2	27.04	29	7.5	9.0	10.9	1.5	2.3
4	6.0	14.0	10.9	8.0	64	30	6.0	9.7	10.1	3.7	13.7
5	6.5	8.3	6.0	1.8	3.24	31	9.5	12.3	6.8	2.8	7.8
6	9.0	9.7	14.3	0.7	0.49	32	7.0	13.0	13.9	6.0	36.0
7	6.5	11.0	8.7	4.5	20.25	33	8.5	11.0	10.9	2.5	6.3
8	6.0	10.3	12.8	4.3	18.49	34	8.5	7.7	9.4	-0.8	0.6
9	7.5	13.0	11.3	5.5	30.25	35	7.0	10.7	11.3	3.7	13.7
10	6.5	10.3	10.5	3.8	14.44	36	7.5	12.0	12.0	4.5	20.3
11	7.0	10.3	12.0	3.3	10.89	37	7.5	12.3	10.9	4.8	23.0
12	9.5	11.0	12.4	1.5	2.25	38	8.0	11.7	11.3	3.7	13.7
13	8.5	13.0	12.4	4.5	20.25	39	7.5	13.7	11.3	6.2	38.4
14	7.5	11.7	10.1	4.2	17.64	รวม	293.5	430.4	421.2	136.9	627
15	8.0	12.3	12.0	4.3	18.49						
16	7.0	10.3	10.9	3.3	10.89						
17	10.5	11.7	13.9	1.2	1.44						
18	8.5	11.7	11.6	3.2	10.24						
19	7.5	7.3	9.0	-0.2	0.04						
20	8.0	11.7	11.3	3.7	13.69						
21	7.5	12.0	12.0	4.5	20.25						
22	6.0	10.3	9.0	4.3	18.49						
23	7.5	7.7	10.1	0.2	0.04						
24	7.5	12.0	11.3	4.5	20.25						
25	6.0	11.7	11.3	5.7	32.49						
26	6.5	12.3	13.5	5.8	33.64						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{293.5}{39} = 7.53$$

$$\overline{X}_{\text{ห}} = \frac{430.4}{39} = 11.04$$

$$\overline{X}_{\text{บ}} = \frac{421.2}{39} = 10.80$$

$$E_1 = \frac{10.80}{15} \times 100 = 72$$

$$E_2 = \frac{11.04}{15} \times 100 = 73.60$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \dfrac{72}{73.60} = 0.98$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \dfrac{11.04 - 7.53}{15} \times 100 = 23.4$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\dfrac{N\sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{136.9}{\sqrt{\dfrac{(39 \times 627) - (136.9)^2}{39 - 1}}}$$

$$t = 11.17$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 5

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D
1	8.0	11.7	11.6	3.7	13.69	27	8.0	9.3	11.3	1.3	1.7
2	7.5	10.0	12.0	2.5	6.25	28	8.0	8.7	10.1	0.7	0.5
3	7.0	11.7	9.8	4.7	22.09	29	8.0	13.0	11.3	5.0	25.0
4	7.5	13.0	11.3	5.5	30.25	30	5.0	9.3	10.1	4.3	18.5
5	6.0	9.7	6.8	3.7	13.69	31	9.0	12.3	14.3	3.3	10.9
6	8.0	9.3	13.9	1.3	1.69	32	10.5	12.7	12.4	2.2	4.8
7	9.0	13.7	15.0	4.7	22.09	33	7.5	11.7	11.3	4.2	17.6
8	7.5	12.7	12.8	5.2	27.04	34	7.5	9.0	9.4	1.5	2.3
9	7.5	12.7	9.0	5.2	27.04	35	7.0	10.7	10.1	3.7	13.7
10	7.5	11.0	10.1	3.5	12.25	36	7.5	11.7	10.9	4.2	17.6
11	7.0	10.7	12.0	3.7	13.69	37	7.5	12.0	13.9	4.5	20.3
12	9.5	10.3	13.5	0.8	0.64	38	8.5	11.0	11.6	2.5	6.3
13	5.0	9.7	12.0	4.7	22.09	39	7.0	12.0	14.3	5.0	25.0
14	8.0	11.7	12.0	3.7	13.69	รวม	297.5	426	439.7	128.5	546.8
15	9.0	10.7	11.6	1.7	2.89						
16	9.0	9.3	5.6	0.3	0.09						
17	7.0	9.6	10.1	2.6	6.76						
18	8.5	10.0	12.4	1.5	2.25						
19	8.5	6.7	9.4	-1.8	3.24						
20	8.5	10.0	10.5	1.5	2.25						
21	8.5	10.7	10.9	2.2	4.84						
22	5.5	10.3	10.9	4.8	23.04						
23	5.5	12.7	10.5	7.2	51.84						
24	7.5	11.0	11.3	3.5	12.25						
25	7.0	11.7	9.8	4.7	22.09						
26	7.0	12.0	13.9	5.0	25						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{297.5}{39} = 7.63$$

$$\overline{X}_{\text{ล}} = \frac{426.0}{39} = 10.92$$

$$\overline{X}_{\text{บ}} = \frac{439.7}{39} = 11.27$$

$$E_1 = \frac{11.2}{15} \times 100 = 75.13$$

$$E_2 = \frac{10.92}{15} \times 100 = 72.80$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \frac{75.13}{72.80} = 1.03$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \frac{10.92 - 7.63}{15} \times 100 = 21.93$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N \sum D^2 - (\sum D)^2}{n - 1}}}$$

$$t = \frac{128.5}{\sqrt{\frac{(39 \times 546.8) - (128.5)^2}{39 - 1}}}$$

$$t = 11.44$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 6

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D
1	8.0	9.0	12.8	1.0	1	27	8.0	11.0	12.0	3.0	9.0
2	8.5	10.0	13.1	1.5	2.25	28	9.0	8.3	11.3	-0.7	0.5
3	6.5	11.3	7.5	4.8	23.04	29	8.0	10.7	10.9	2.7	7.3
4	7.5	11.3	10.9	3.8	14.44	30	5.5	10.3	10.5	4.8	23.0
5	5.5	9.3	7.5	3.8	14.44	31	7.5	13.7	13.5	6.2	38.4
6	8.0	9.0	13.5	1.0	1	32	10.5	11.3	12.8	0.8	0.6
7	9.0	11.7	11.6	2.7	7.29	33	7.0	12.0	11.6	5.0	25.0
8	4.5	11.0	13.9	6.5	42.25	34	7.0	7.3	9.8	0.3	0.1
9	8.0	10.3	11.6	2.3	5.29	35	6.5	11.0	10.1	4.5	20.3
10	8.0	10.7	10.5	2.7	7.29	36	6.0	11.7	10.9	5.7	32.5
11	7.0	9.3	12.0	2.3	5.29	37	8.0	12.3	8.6	4.3	18.5
12	11.0	11.7	14.3	0.7	0.49	38	9.5	9.7	12.4	0.2	0.0
13	4.5	11.3	10.9	6.8	46.24	39	7.0	11.7	12.0	4.7	22.1
14	7.0	11.7	9.0	4.7	22.09	รวม	293.5	417.3	248.1	124	581.6
15	8.0	11.3	11.6	3.3	10.89						
16	9.5	10.0	4.3	0.5	0.25						
17	10.0	12.7	10.1	2.7	7.29						
18	8.5	10.0	12.0	1.5	2.25						
19	10.0	7.3	9.4	-2.7	7.29						
20	7.5	11.3	10.1	3.8	14.44						
21	7.0	13.7	14.3	6.7	44.89						
22	6.0	11.0	9.8	5.0	25						
23	3.5	6.7	10.9	3.2	10.24						
24	8.5	11.0	11.3	2.5	6.25						
25	6.5	11.7	8.3	5.2	27.04						
26	6.0	12.0	10.5	6.0	36						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{293.5}{39} = 7.5$$

$$\overline{X}_{\text{ล}} = \frac{417.3}{39} = 10.7$$

$$\overline{X}_{\text{ข}} = \frac{428.1}{39} = 10.98$$

$$E_1 = \frac{10.98}{15} \times 100 = 73.18$$

$$E_2 = \frac{10.7}{15} \times 100 = 71.33$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \frac{73.18}{71.33} = 1.03$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \frac{10.7 - 7.5}{15} \times 100 = 21.33$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N \sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n - 1}}}$$

$$t = \frac{123.8}{\sqrt{\frac{(39 \times 581.6) - (123.8)^2}{39 - 1}}}$$

$$t = 8.91$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 7

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D
1	8.0	12.0	12.0	4.0	16	27	7.0	11.0	12.0	4.0	16.0
2	8.0	11.0	10.5	3.0	9	28	7.5	10.7	12.4	3.2	10.2
3	7.5	11.3	13.9	3.8	14.44	29	7.5	11.0	10.5	3.5	12.3
4	6.0	11.7	8.6	5.7	32.49	30	5.5	10.0	10.9	4.5	20.3
5	6.0	12.0	6.4	6.0	36	31	10.0	12.3	13.9	2.3	5.3
6	9.5	10.0	13.5	0.5	0.25	32	8.5	14.0	14.6	5.5	30.3
7	7.5	13.0	12.0	5.5	30.25	33	6.5	11.3	10.9	4.8	23.0
8	6.5	10.7	13.1	4.2	17.64	34	7.0	7.3	9.4	0.3	0.1
9	8.0	11.0	12.0	3.0	9	35	6.5	11.0	11.3	4.5	20.3
10	7.5	10.7	10.5	3.2	10.24	36	6.5	12.0	10.5	5.5	30.3
11	6.5	10.3	13.1	3.8	14.44	37	6.5	13.3	10.5	6.8	46.2
12	9.0	8.7	13.5	-0.3	0.09	38	10.0	11.7	11.1	1.7	2.9
13	5.0	13.7	13.9	8.7	75.69	39	7.0	8.0	9.4	1.0	1.0
14	7.0	11.0	8.7	4.0	16	รวม	287.0	443.5	434.5	146.5	667.7
15	7.5	10.7	9.4	3.2	10.24						
16	5.0	9.7	6.0	4.7	22.09						
17	7.5	11.0	11.3	3.5	12.25						
18	7.5	11.7	12.4	4.2	17.64						
19	7.0	11.7	10.9	4.7	22.09						
20	7.0	11.0	8.3	4.0	16						
21	7.5	10.7	13.1	3.2	10.24						
22	8.0	10.3	9.0	2.3	5.29						
23	10.0	12.0	11.6	2.0	4						
24	8.0	11.7	12.0	3.7	13.69						
25	6.5	10.3	10.9	3.8	14.44						
26	7.5	12.0	10.5	4.5	20.25						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{287}{39} = 7.36$$

$$\overline{X}_{\text{ล}} = \frac{443.5}{39} = 11.37$$

$$\overline{X}_{\text{บ}} = \frac{434.5}{39} = 11.14$$

$$E_1 = \frac{11.14}{15} \times 100 = 74.27$$

$$E_2 = \frac{11.37}{15} \times 100 = 75.8$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \frac{74.27}{75.8} = 0.98$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \frac{11.37 - 7.36}{15} \times 100 = 26.73$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N\sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{146.5}{\sqrt{\frac{(39 \times 667.7) - (146.5)^2}{39 - 1}}}$$

$$t = 13.34$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 8

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (15)	คะแนน หลังเรียน (15)	คะแนน กระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (15)	คะแนน หลังเรียน (15)	คะแนน กระบวนการ (15)	D	D*D
1	8.5	11.0	6.0	2.5	6.25	27	7.0	10.7	7.9	3.7	13.7
2	6.5	10.0	8.6	3.5	12.25	28	7.5	11.3	10.9	3.8	14.4
3	5.5	8.3	9.4	2.8	7.84	29	8.5	10.0	8.3	1.5	2.3
4	8.5	12.0	11.3	3.5	12.25	30	7.0	9.7	10.5	2.7	7.3
5	5.0	6.3	7.1	1.3	1.69	31	7.0	13.0	10.9	6.0	36.0
6	8.5	9.0	12.8	0.5	0.25	32	8.0	11.7	11.3	3.7	13.7
7	7.0	9.0	13.5	2.0	4	33	8.0	11.0	10.9	3.0	9.0
8	7.0	11.0	12.4	4.0	16	34	6.0	7.0	10.1	1.0	1.0
9	8.0	10.3	9.8	2.3	5.29	35	7.0	10.7	11.3	3.7	13.7
10	5.5	10.0	10.9	4.5	20.25	36	6.5	9.0	5.6	2.5	6.3
11	7.5	10.3	10.9	2.8	7.84	37	8.0	12.7	7.5	4.7	22.1
12	7.5	8.0	10.5	0.5	0.25	38	9.5	10.7	9.4	1.2	1.4
13	7.0	12.0	11.3	5.0	25	39	6.5	10.7	9.8	4.2	17.6
14	7.0	12.7	9.4	5.7	32.49	รวม	280.5	408.8	386.6	128.3	504.7
15	8.0	10.0	7.1	2.0	4						
16	5.5	9.0	3.8	3.5	12.25						
17	6.0	10.0	8.3	4.0	16						
18	8.5	11.0	11.3	2.5	6.25						
19	6.5	12.0	9.8	5.5	30.25						
20	7.5	9.3	10.1	1.8	3 24						
21	8.5	13.7	12.0	5.2	27.04						
22	5.5	9.0	10.1	3.5	12.25						
23	6.0	11.3	11.6	5.3	28.09						
24	9.0	11.7	12.0	2 7	7.29						
25	7.5	11.7	11.3	4.2	17.64						
26	6.5	12.0	10.9	5.5	30.25						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{ก} = \frac{280.5}{39} = 7.19$$

$$\overline{X}_{ล} = \frac{408.8}{39} = 10.48$$

$$\overline{X}_{น} = \frac{386.6}{39} = 9.91$$

$$E_1 = \frac{9.91}{15} \times 100 = 66.07$$

$$E_2 = \frac{10.48}{15} \times 100 = 69.87$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \frac{66.07}{69.87} = 0.95$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \frac{10.48 - 7.19}{15} \times 100 = 21.93$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N\sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{128.3}{\sqrt{\frac{(39 \times 504.7) - (128.3)^2}{39-1}}}$$

$$t = 13.93$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 9

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (15)	คะแนน หลังเรียน (15)	คะแนน กระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (15)	คะแนน หลังเรียน (15)	คะแนน กระบวนการ (15)	D	D*D
1	8.0	10.3	11.3	2.3	5.29	27	7.5	9.3	9.3	1.8	3.2
2	6.5	11.0	7.5	4.5	20.25	28	9.0	6.0	6.0	-3.0	9.0
3	6.5	6.3	6.4	-0.2	0.04	29	8.0	10.0	10.0	2.0	4.0
4	7.5	12.3	10.5	4.8	23.04	30	5.5	6.3	6.3	0.8	0.6
5	5.0	5.7	8.6	0.7	0.49	31	12.5	11.7	11.7	-0.8	0.6
6	7.0	8.3	6.0	1.3	1.69	32	8.5	11.7	11.7	3.2	10.2
7	8.5	12.7	12.0	4.2	17.64	33	8.5	11.0	11.0	2.5	6.3
8	7.0	9.3	6.0	2.3	5.29	34	7.0	7.0	10.1	0.0	0.0
9	8.5	11.7	13.1	3.2	10.24	35	6.5	10.0	9	3.5	12.3
10	9.0	11.3	10.5	2.3	5.29	36	7.0	11.7	10.1	4.7	22.1
11	7.0	10.3	10.5	3.3	10.89	37	7.0	11.0	12.4	4.0	16.0
12	6.0	9.3	6.0	3.3	10.89	38	8.5	3.7	10.5	-4.8	23.0
13	6.5	11.7	11.6	5.2	27.04	39	6.0	11.0	12.0	5.0	25.0
14	7.0	12.3	9.4	5.3	28.09	รวม	284.5	385.6	381.6	101.1	463.9
15	8.5	12.0	11.3	3.5	12.25						
16	7.5	8.7	4.5	1.2	1.44						
17	8.0	10.0	10.1	2.0	4						
18	8.5	12.0	12.4	3.5	12.25						
19	7.0	7.7	10.1	0.7	0.49						
20	7.0	10.0	9.8	3.0	9						
21	6.5	9.3	11.3	2.8	7.84						
22	3.0	10.3	9.0	7.3	53.29						
23	5.5	9.0	10.1	3.5	12.25						
24	8.0	10.7	11.3	2.7	7.29						
25	7.5	12.0	11.3	4.5	20.25						
26	6.0	11.0	10.9	5.0	25						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{284.5}{39} = 7.29$$

$$\overline{X}_{\text{ค}} = \frac{385.6}{39} = 9.89$$

$$\overline{X}_{\text{ข}} = \frac{381.6}{39} = 9.78$$

$$E_1 = \frac{9.78}{15} \times 100 = 65.2$$

$$E_2 = \frac{9.89}{15} \times 100 = 65.9$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \dfrac{65.2}{65.9} = 0.99$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \dfrac{9.89 - 7.29}{15} \times 100 = 17.33$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\dfrac{N \sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n - 1}}}$$

$$t = \frac{101.1}{\sqrt{\dfrac{(39 \times 463.9) - (101.1)^2}{39 - 1}}}$$

$$t = 7.03$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ปฏิบัติการที่ 10

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D	คนที่	คะแนนก่อนเรียน (15)	คะแนนหลังเรียน (15)	คะแนนกระบวนการ (15)	D	D*D
1	6.0	10.3	9.8	4.3	18.49	27	7.0	9.3	7.8	2.3	5.3
2	7.0	11.7	8.3	4.7	22.09	28	6.5	8.0	11.2	1.5	2.3
3	6.0	9.0	6.4	3.0	9.0	29	7.5	10.0	11.2	2.5	6.3
4	7.0	12.3	11.6	5.3	28.09	30	7.5	7.0	10.1	-0.5	0.3
5	6.5	8.0	4.9	1.5	2.25	31	6.0	12.3	12.0	6.3	39.7
6	7.5	9.3	6.0	1.8	3.24	32	10.5	11.3	13.1	0.8	0.6
7	8.5	8.0	12.0	-0.5	0.25	33	9.0	11.7	10.9	2.7	7.3
8	6.5	9.3	6.0	2.8	7.84	34	8.0	7.7	10.1	-0.3	0.1
9	8.5	12.0	13.5	3.5	12.25	35	7.0	9.7	10.1	2.7	7.3
10	7.0	11.0	10.5	4.0	16.0	36	8.0	11.7	6.4	3.7	13.7
11	7.0	11.3	9.8	4.3	18.49	37	7.0	13.7	12.4	6.7	44.9
12	10.0	9.3	8.3	-0.7	0.49	38	8.0	11.7	11.3	3.7	13.7
13	7.5	10.7	11.3	3.2	10.24	39	7.0	12.7	9.4	5.7	32.5
14	7.5	12.0	10.5	4.5	20.25	รวม	286.5	416.8	390.3	131.1	583.2
15	8.5	11.3	10.9	2.8	7.84						
16	7.0	11.7	5.3	4.7	22.09						
17	6.0	11.3	11.3	5.3	28.09						
18	7.0	12.0	12.0	5.0	25.0						
19	7.0	12.7	10.1	5.7	32.49						
20	7.5	11.3	9.8	3.8	14.44						
21	8.5	10.0	12.0	1.5	2.25						
22	5.5	11.3	9.0	5.8	33.64						
23	7.5	11.3	10.1	3.8	14.44						
24	7.5	10.7	11.3	3.2	10.24						
25	7.0	12.0	12.4	5.0	25.0						
26	6.0	11.0	11.2	5.0	25.0						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{\text{ก}} = \frac{286.5}{39} = 7.34$$

$$\overline{X}_{\text{ล}} = \frac{416.8}{39} = 10.69$$

$$\overline{X}_{\text{ข}} = \frac{390.3}{39} = 10.00$$

$$E_1 = \frac{10.0}{15} \times 100 = 66.67$$

$$E_2 = \frac{10.69}{15} \times 100 = 71.27$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \frac{66.67}{71.28} = 0.94$

ร้อยละความก้าวหน้า $= \frac{10.69 - 7.34}{15} \times 100 = 22.33$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{N\sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{131.1}{\sqrt{\frac{(39 \times 583.2) - (131.1)^2}{39-1}}}$$

$$t = 10.83$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

รวมทุกปฏิบัติการ

คนที่	คะแนนก่อนเรียน (150)	คะแนนหลังเรียน (150)	คะแนนกระบวนการ (150)	D	D*D	คนที่	คะแนนก่อนเรียน (150)	คะแนนหลังเรียน (150)	คะแนนกระบวนการ (150)	D	D*D
1	79.5	104.7	109.2	25.2	635.04	27	76	110.8	107.3	34.8	1211
2	78	107	98.9	29	841	28	81	101.9	105.6	20.9	436.81
3	74	105.6	91.5	31.6	998.56	29	83.1	109.4	103.3	26.3	691.69
4	74	119.1	108.5	45.1	2034	30	62.5	92.4	96.8	29.9	894.01
5	60.5	87.4	75.3	26.9	723.61	31	85.5	121.9	121.2	36.4	1325
6	83.5	94.9	109	11.4	129.96	32	90	125.9	129.7	35.9	1288.8
7	82	115.9	119.7	33.9	1149.2	33	82	116.2	116.4	34.2	1169.6
8	68.5	100	107.2	31.5	992.25	34	74.5	76.8	98.5	2.3	5.29
9	81.5	116.3	113.1	34.8	1211	35	70	107.7	108.3	37.7	1421.3
10	73.5	105	104.8	31.5	992.25	36	74.5	117.3	102.4	42.8	1831.8
11	71.5	108.4	118	36.9	1361.6	37	74	124.1	112.5	50.1	2510
12	89.5	98.6	117.7	9.1	82.81	38	88	100.6	111.1	12.6	158.76
13	59.5	111.7	111	52.2	2724.8	39	70	116.5	108.9	46.5	2162.3
14	74	123	109	49	2401	รวม	2947.1	4208.2	4151.9	1253.1	45333
15	83	114.6	103.6	31.6	998.56						
16	72.5	95.1	64.1	22.6	510.76						
17	81	103.1	105.7	22.1	488.41						
18	80.5	114.4	119	33.9	1149.2						
19	76.5	89.8	96.5	13.3	176.89						
20	76.5	110.4	100.4	33.9	1149.2						
21	78	117.9	123.9	39.9	1592						
22	60.5	99.6	96.1	39.1	1528.8						
23	62.5	96.8	102.6	34.3	1176.5						
24	79.5	114.4	110.8	34.9	1218						
25	69	114.3	99.7	45.3	2052.1						
26	67	110.7	114.6	43.7	1909.7						

หมายเหตุ

อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

$$\overline{X}_{n} = \frac{2947.1}{39} = 75.57$$

$$\overline{X}_{a} = \frac{4200.2}{39} = 107.6$$

$$\overline{X}_{u} = \frac{4145.9}{39} = 106.46$$

$$E_1 = \frac{106.46}{150} \times 100 = 70.97$$

$$E_2 = \frac{107.6}{150} \times 100 = 71.73$$

ประสิทธิภาพของแบบฝึก $= E_1 / E_2 = \dfrac{70.97}{71.73} = 0.99$

ร้อยละของความก้าวหน้า $= \dfrac{107.6 - 75.57}{150} \times 100 = 21.35$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\dfrac{N\sum D^2 - \left(\sum D\right)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{1253.1}{\sqrt{\dfrac{(39 \times 45333) - (1253.1)^2}{39-1}}}$$

$$t = 17.37$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก ค

เครื่องมือวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

แบบสอบถามความคิดรวบยอด ทักษะ และทัศนคติของนักศึกษาที่มีต่อการเรียนโดยการปฏิบัติการในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์

ให้นักศึกษาทำเครื่องหมาย X ลงในช่องที่สอดคล้องกับความคิดเห็นของนักศึกษามากที่สุด

1 = ไม่มี 2 = น้อย 3 = ปานกลาง 4 = มาก 5 = มากที่สุด

ความคิดเห็น	1 = ไม่มี	2 = น้อย	3 =ปานกลาง	4 = มาก	5 = มากที่สุด
1. ท่านได้อ่านบทปฏิบัติการ					
2. ท่านมีความสามารถในการใช้เครื่องมือในบทปฏิบัติการนี้					
3. ท่านมีความมั่นใจในการใช้เครื่องมือ					
4. ท่านมีความเข้าใจวิธีการทดลองในปฏิบัติการนี้					
5. ปฏิบัติการนี้มีความชัดเจน					
6. ท่านมีความสนุกในการทำปฏิบัติการ					
7. ท่านสามารถนำเทคนิคที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป					
8. ท่านสามารถบรรลุจุดประสงค์ของการทดลองนี้					

9. ให้เขียนตอบหลักการที่สำคัญของเรื่องในหัวข้อ 9.1-9.10 และจะมีการให้คะแนนเป็น 5 ระดับ

9.1 หลักการที่สำคัญของการแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ คือ

9.2 หลักการที่สำคัญของการทำเรพลิกาพลตคือ

9.3 หลักการที่สำคัญของการดูแลรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียคือ

9.4 หลักการที่สำคัญของการทำไลโอฟิไลเซชันคือ

9.5 หลักการที่สำคัญของการสร้างสายพันธุ์กลายคือ

9.6 หลักการที่สำคัญของการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดคือ

9.7 หลักการที่สำคัญของการสกัดพลาสมิดคือ

9.8 หลักการที่สำคัญของดีเอ็นเออิเล็กโตรโฟลิสิสคือ

9.9 หลักการที่สำคัญของการแปลงหรือ Transformation คือ

9.10 หลักการที่สำคัญของการคอนจูเกชันคือ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

แบบสังเกตพฤติกรรมการปฏิบัติการ

ชุดการสอนเรื่อง.. เริ่มเวลา ....
ชื่อนักศึกษา.. สิ้นสุดเวลา ....

คำชี้แจง โปรดทำเครื่องหมาย X ลงในช่องใดช่องหนึ่งที่จัดไว้ทางขวาให้ตรงกับระดับความเห็นของท่าน ซึ่งกำหนดความหมายของแต่ละระดับไว้ดังนี้

1 = ทำได้บ้างส่วนใหญ่คนอื่นช่วย
2 = ทำได้เองเป็นส่วนใหญ่
3 = ทำได้ครบถ้วนสมบูรณ์แต่ยังไม่ชำนาญ/คล่อง
4 = ทำได้ครบถ้วนสมบูรณ์และชำนาญแต่ยังแนะนำคนอื่นไม่ได้
5 = ทำได้ครบถ้วนสมบูรณ์และชำนาญดี สามารถแนะนำคนอื่นได้

หัวข้อประเมิน	ระดับความเห็น				
	1	2	3	4	5
1. การศึกษาคู่มือปฏิบัติการ					
2. การวางแผนการทดลอง					
3. การจัดเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์สารทดลอง					
4. การใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ระหว่างการทดลอง					
5. การบันทึกข้อมูลระหว่างการทดลอง					
6. การแก้ปัญหาระหว่างการทดลอง					
7. การสรุปผลการทดลอง					
8. การจัดเก็บเครื่องมือและอุปกรณ์เมื่อเสร็จ					

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University