บทที่ 3
วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ใช้วิธีประมวลค่าพารามิเตอร์ไดอิเล็กทริกของโพรโทพลาสต์จากใบอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสับปะรดสายพันธุ์ภูเก็ตในห้องทดลองที่มีอายุเท่ากันโดยแยกกลุ่มเซลล์ที่ยึดติดกันเป็นเนื้อเยื่อให้ออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ย่อยจนได้โพรโทพล์าสต์ จากนั้นอาศัยข้อมูลที่ได้จากการวัดความเร็วของเซลล์ขณะเกิดไดอิเล็กโทรฟอเรซิสภายใต้สนามไฟฟ้าแบบกระแสสลับที่กำเนิดจากขั้วอิเล็กโทรดทรงกระบอกคู่ขนาน คำนวณค่าพารามิเตอร์ไดอิเล็กทริกของเซลล์โดยวิธีการเขียนโปรแกรมคำนวณซึ่งสัมพันธ์กับความเร็วของเซลล์ ตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เซลล์เดี่ยวทรงกลมเปลือกเซลล์หนึ่งชั้น(Spherical Single Shell Model, SSM) หากผลการวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกันจะทดลองใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เซลล์เดี่ยวทรงกลมเปลือกเซลล์สองชั้น (Spherical Double Shell Model, SDM) เพื่อเปรียบเทียบความเป็นไปได้และความเหมาะสมของแบบจำลองทางไฟฟ้า ค่าพารามิเตอร์ไดอิเล็กทริกที่คำนวณหาได้แก่ สภาพนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ สภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของเยื่อหุ้มเซลล์ และค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของไซโทพลาสซึม

ขั้นตอนทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมต้นพันธุ์สับปะรดภูเก็ตโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ขั้นตอนที่ 2 เตรียมโพรโทพลาสต์สับปะรดภูเก็ต ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ย่อย
ขั้นตอนที่ 3 เตรียมชุดอุปกรณ์แมนนิพูเลเตอร์และขั้วอิเล็กโทรดเพื่อเหนี่ยวนำโพรโท-พลาสต์เดี่ยวสำหรับศึกษาการเกิดไดอิเล็กโทรฟอเรซิส
ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาสภาวะไดอิเล็กโทรฟอเรซิสของโพรโทพลาสต์สับปะรดภูเก็ต
ขั้นตอนที่ 5 คำนวณความเร็วไดอิเล็กโทรฟอเรซิส
ขั้นตอนที่ 6 เขียนโปรแกรมคำนวณค่าสภาพนำไฟฟ้าและสภาพยอมของโพรโทพลาสต์สับปะรดภูเก็ต ตามแบบจำลองทางไฟฟ้าเซลล์เดี่ยวทรงกลม บนไมโครคอมพิวเตอร์
ขั้นตอนที่ 7 ประมวลผล
ขั้นตอนที่ 8 วิเคราะห์ และสรุปผล

สรุปขั้นตอนการทดลองได้เป็นสามส่วนหลักได้แก่

1. การทดลองเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสับปะรดและเตรียมโพรโทพลาสต์
2. การทดลองไดอิเล็กโทรฟอเรซิสและวัดความเร็วไดอิเล็กโทรฟอเรติก
3. การเขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์คำนวณค่าไดอิเล็กทริกตามแบบจำลองทางไฟฟ้าของเซลล์

อุปกรณ์การทดลอง

อุปกรณ์สำหรับการย่อยผนังเซลล์

เครื่องชั่งน้ำหนักระบบดิจิตอลแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

เตาให้ความร้อนแบบที่มีเครื่องกวน (Hot plate with magnetic stirrer)

เครื่องปั่นแยก (centrifuge)

จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 mm

เครื่องเขย่า

มีดผ่าตัด

หลอดดูดพร้อมจุกยาง

หลอดปั่นแยกขนาด 1 และ 15 ml

เครื่องปั่นแยกขนาดเล็ก

ชุดทดลองสำหรับศึกษาไดอิเล็กโทรฟอเรซิส

กล้องจุลทัศน์แบบหัวกลับ กำลังขยายสูงสุด 600 เท่า

ชุดจับยึดอิเล็กโทรด (Manipulation)

ชุดอุปกรณ์ดึงลวดพร้อมอุปกรณ์ปรับกระแสและแรงดันไฟฟ้ากระแสสลับ

เครื่องดึงหลอดแก้วแคพิลลารี

ระบบบันทึกภาพและเสียง พร้อมอุปกรณ์แปลงสัญญาณภาพ (color video camera)

แผ่นแก้วสไลด์

อุปกรณ์สำหรับวัดความหนืดสารละลาย

เครื่องวัดสภาพนำไฟฟ้า

ไมโครปิเปต

ม้วนวีดีโอและฟิลม์ถ่ายรูป

อุปกรณ์ผลิตสนามไฟฟ้าและที่เกี่ยวข้อง

เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ

ออสซิลโลสโคปแบบ 2 ช่องสัญญาณ

สายโคแอกเชียล รุ่น RQ –58A/V หัวต่อแบบ M-BNC

อุปกรณ์วัดความเร็วเซลล์ในสนามไฟฟ้า

โทรทัศน์สีและเครื่องเล่นวีดีโอเทป

นาฬิกาจับเวลา

อุปกรณ์คำนวณ

ไมโครคอมพิวเตอร์ Intel Pentium 3 จำนวน 2 เครื่อง

3.1 การทดลองเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสับปะรดและเตรียมโพรโทพลาสต์

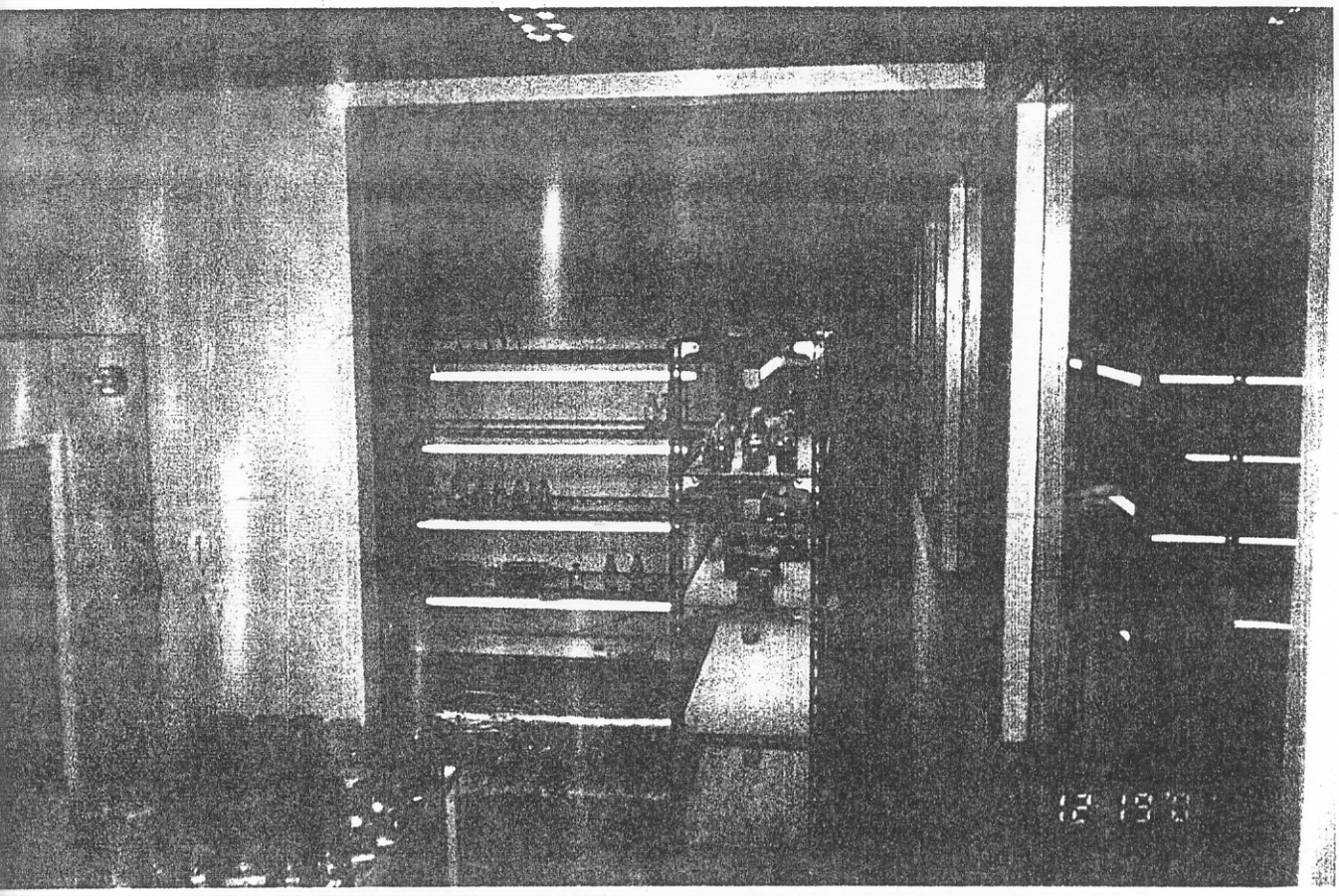
เตรียมต้นพันธุ์สับปะรดภูเก็ตโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ใช้ยอดอ่อนสับปะรดภูเก็ตล้างน้ำสะอาด นำไปฆ่าเชื้อใน clorox 20% เติม Tween 20 1-2หยด นาน 20 นาที แช่ใน clorox 10 % นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำมาผ่าแบ่งตายอดออกเป็น 4 ส่วน โดยให้ผ่านจุดเจริญ ในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ และเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS(1/2 macro , micro , iron) + BA 0.5 ppm วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 –110 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ 16 ชม./ วัน เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ ตายอดสับปะรดแต่ละส่วน (4 ส่วน) จะเริ่มแตกหน่อย่อยตั้งแต่ 2 สัปดาห์แรกหลังการเพาะเลี้ยง ประมาณ 10 สัปดาห์ จะเกิดหน่อย่อยเฉลี่ย 12 หน่อ ต่อ ตายอดแต่ละส่วน ความยาวหน่อประมาณ 1.5 ซม. จากนั้นนำมาแบ่งหน่อย่อยและเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเดิม จะได้ต้นอ่อนสับปะรดภูเก็ตจำนวนมาก จนต้นอ่อนสับปะรดอายุได้ 7 เดือน จะมีใบสมบูรณ์ แข็งแรง เจริญเต็มขวดขนาด 8 ออนซ์ ตามรูปประกอบที่ 3

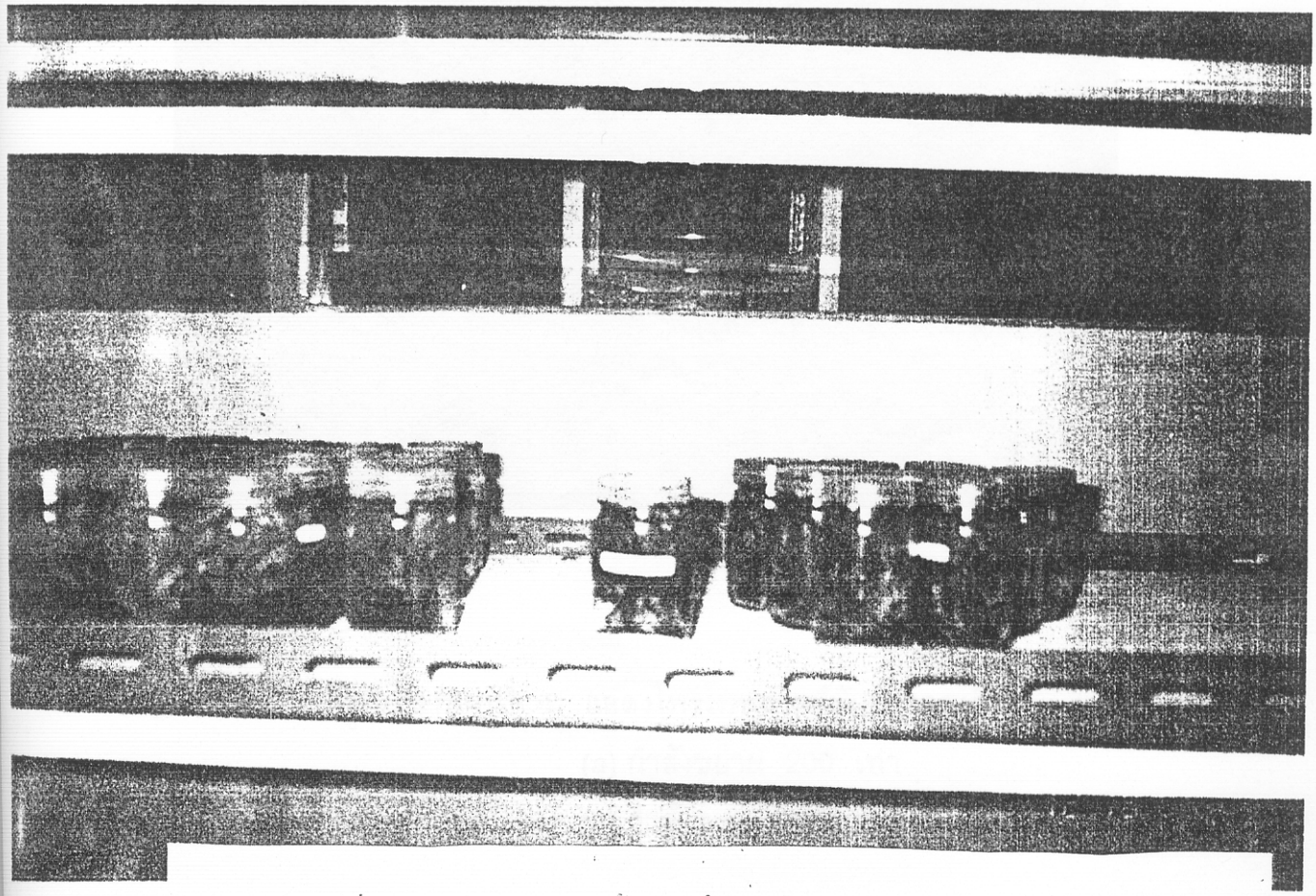
การเตรียมโพรโทพลาสต์สับปะรดภูเก็ต

สกัดโพรโทพลาสต์สับปะรดภูเก็ตจากใบอ่อนของต้นสับปะรดภูเก็ตด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ย่อย ดังขั้นตอนต่อไปนี้

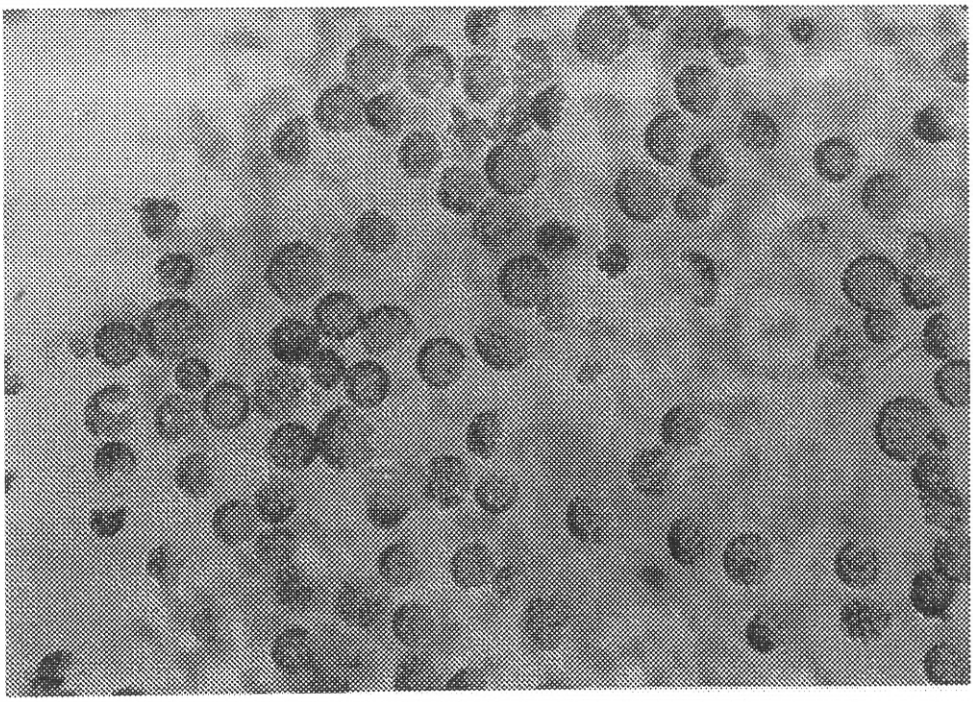
เลือกใบอ่อนสับปะรดที่มีขนาดประมาณ 0.5 x 6 cm นำไปล้างน้ำสะอาดแล้วซับให้แห้ง ตัดปลายยอดออกประมาณ 2 cm แล้วนำไปชั่งหาอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักใบต่อปริมาตรเอนไซม์ 1:10 หั่นใบเป็นแว่นเล็ก ๆโดยใช้มีดหั่นตามแนวขวางใบเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการย่อย แล้วนำไปผสมกับเอนไซม์สูตร 1% cellulase + 0.5% driselase +0.25% macerozyme + 0.6 M mannitol (ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย)ซึ่งเป็นของเหลวในจานเพาะเลี้ยง นำจานไปเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส นาน 2-2.5 ชั่วโมง เมื่อสกัดโพรโทพลาสต์ได้จึงนำไปทำการคัดแยกโพรโทพลาสต์ออกจากเศษเนื้อเยื่อด้วยวิธี sucrose gradient โดยใช้สารละลาย 0.6 M sucrose ปั่นแยกที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำไปล้างสารละลายเดิมแล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที โพรโทพลาสต์สับปะรดที่สกัดได้มีลักษณะกลม รัศมีเซลล์ประมาณ 20-30 ไมครอน ตามรูปประกอบที่ 4



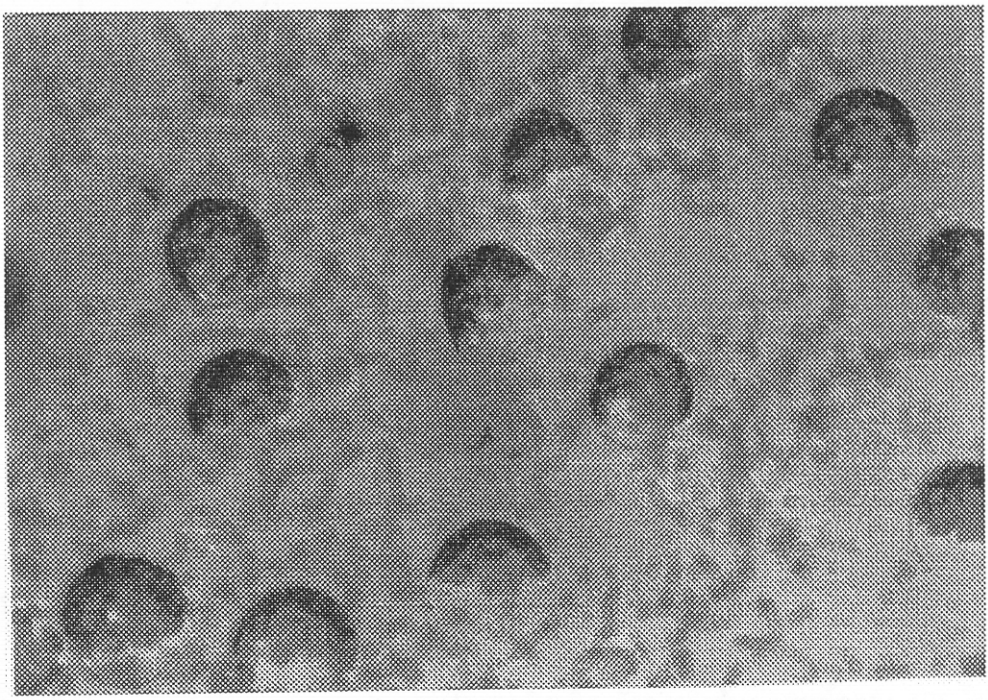
รูปประกอบที่ 3 (a) ต้นอ่อนสับปะรดภูเก็ตเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิทยาลัยชุมชนภูเก็ต



รูปประกอบที่ 3 (b) ต้นอ่อนเพาะเลี้ยงบนชั้นที่ให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์



(a)



(b)

รูปประกอบที่ 4 แสดงโพรโทพลาสต์สับปะรดภูเก็ต

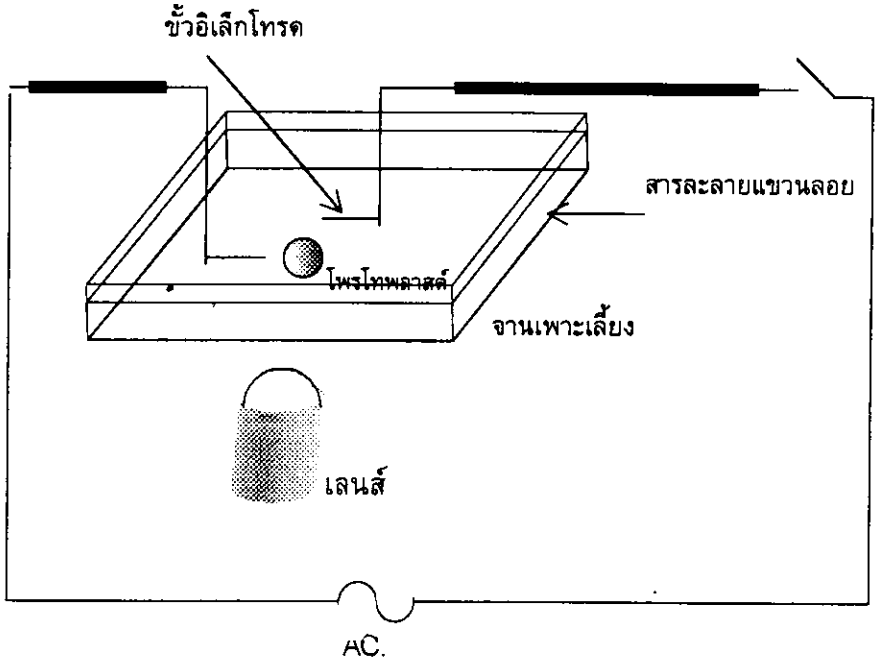
(a) กำลังขยาย 200 เท่า

(b) กำลังขยาย 400 เท่า

3.2 การทดลองไดอิเล็กโทรฟอเรซิสและวัดความเร็วไดอิเล็กโทรฟอเรติก

เตรียมชุดอุปกรณ์เพื่อเหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์เกิดไดอิเล็กโทรฟอเรซิส

จัดชุดอุปกรณ์จับยึดขั้วอิเล็กโทรดแบบไมโครไว้ที่ด้านข้างของกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับเพื่อใช้บังคับควบคุมทิศทางขั้วอิเล็กโทรดซึ่งจุ่มอยู่ในภาชนะที่มีสารละลายแขวนลอยให้โพรโทพลาสต์อยู่ให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการโดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ จ่ายศักย์ไฟฟ้าแบบกระแสสลับเข้ากับขั้วอิเล็กโทรดเพื่อให้เกิดสนามไฟฟ้าเหนี่ยวนำให้โพรโทพลาสต์เกิดไดอิเล็กโทรฟอ-เรซิส ตามรูปประกอบที่ 5



รูปประกอบที่ 5 แสดงชุดอุปกรณ์จับยึดขั้วอิเล็กโทรดเพื่อศึกษาไดอิเล็กโทรฟอเรซิส

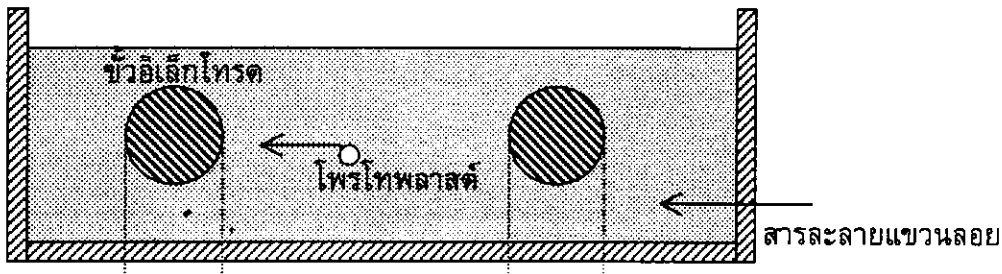
ใช้ขั้วอิเล็กโทรดแบบทรงกระบอกคู่ขนานทำจากนิกเกิล-อัลลอย เส้นผ่าศูนย์กลาง 125 ไมครอน วางห่างกันเป็นระยะ 250 ไมครอน คงที่ตลอดการทดลอง จัดให้โพรโทพลาสต์อยู่ที่ตำแหน่งตรงกลางระหว่างขั้วอิเล็กโทรด(ดูรูปประกอบที่6)แล้วทดลองให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วอิเล็กโทรดเพื่อให้เกิดไดอิเล็กโทรฟอเรซิส

การวัดความเร็วไดอิเล็กโทรฟอเรติก

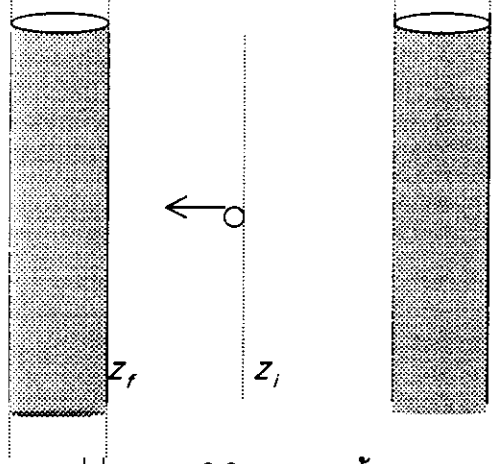
จัดตำแหน่งให้โพรโทพลาสต์อยู่ที่ตำแหน่ง $z_0 = 0$ ด้วยชุดอุปกรณ์จับยึดขั้วอิเล็กโทรดแบบไมโคร ทดลองให้ความถี่และความต่างศักย์แก่ขั้วอิเล็กโทรด โดยเริ่มจากความถี่ย่านสูง30 MHz ลดลงมาถึงประมาณ 10 kHz บันทึกภาพโพรโทพลาสต์ขณะเคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วอิเล็กโทรดด้วยระบบบันทึกภาพและเสียงที่ต่อเข้ากับกล้องจุลทรรศน์ลงในม้วนวีดีโอ นำม้วนวีดีโอดังกล่าวมาเล่นภาพย้อนกลับไปมาเพื่อบันทึกปริมาณเหล่านี้

- ตำแหน่งเริ่มต้นและตำแหน่งสุดท้ายของการเคลื่อนที่ $(z_i - z_f)$
- ระยะทางเคลื่อนที่ (Δz)
- เวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (t)

ภาพที่ปรากฏในม้วนวีดีโอจะมีลักษณะตามรูปประกอบ 6.2

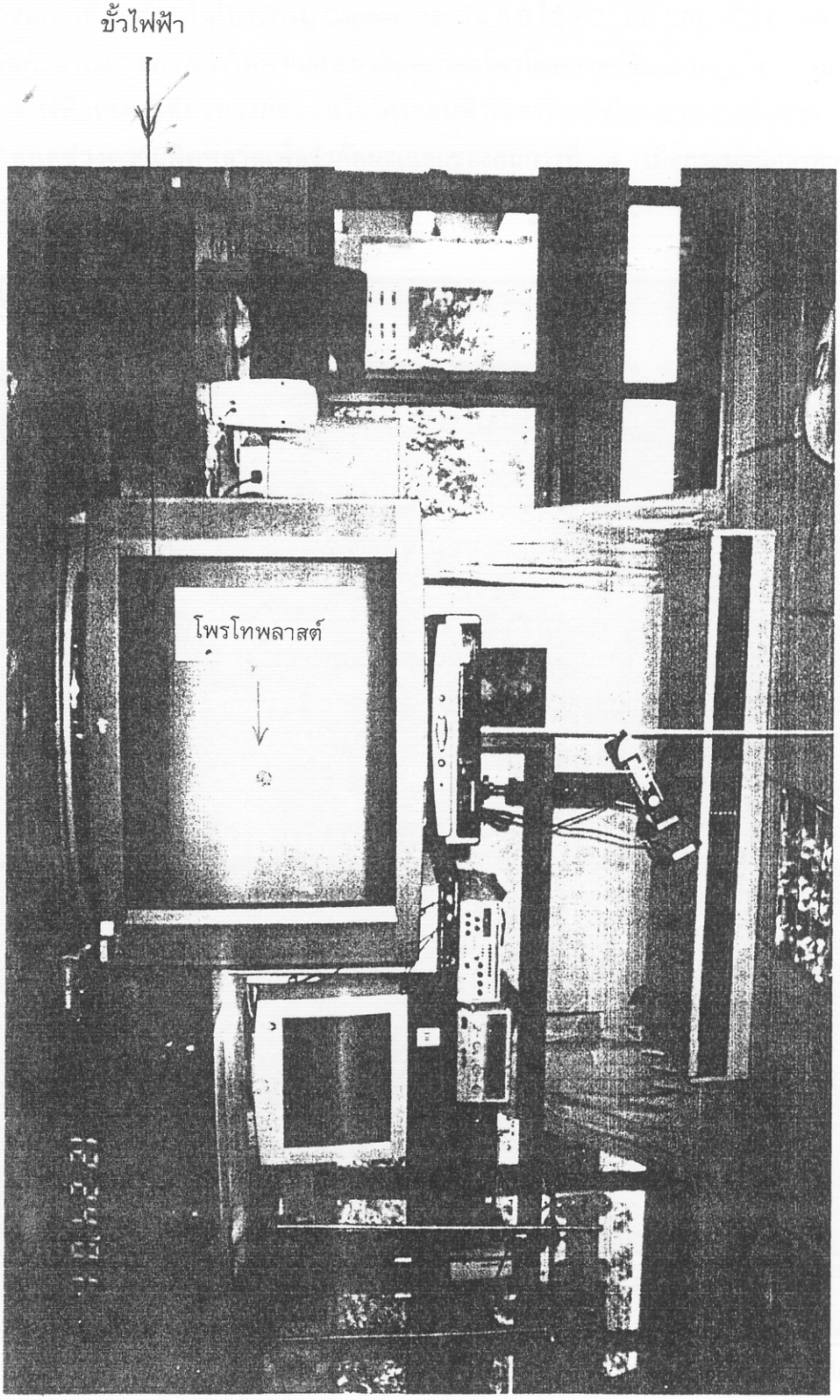


รูปประกอบ 6.1 ภาพมองด้านข้าง



รูปประกอบ 6.2 ภาพมองด้านบน

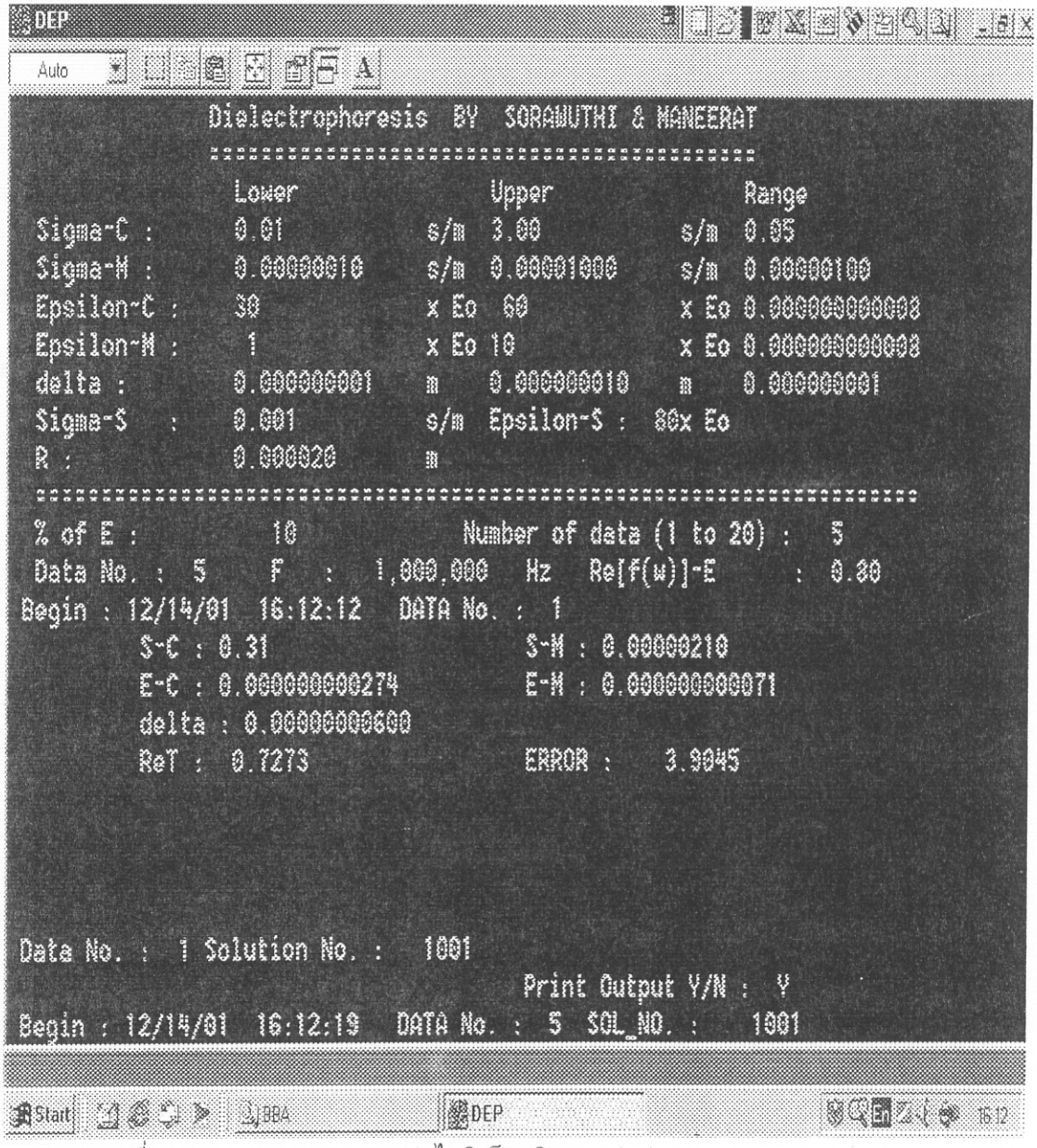
รูปประกอบที่ 6.1แสดงการจัดตำแหน่งโพรโทพลาสต์และวิธีวัดความเร็วไดอิเล็กโทรฟอเรติก มองด้านข้าง และ 6.2 มองด้านบน ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเดียวกับที่ปรากฏในม้วนวีดีโอ



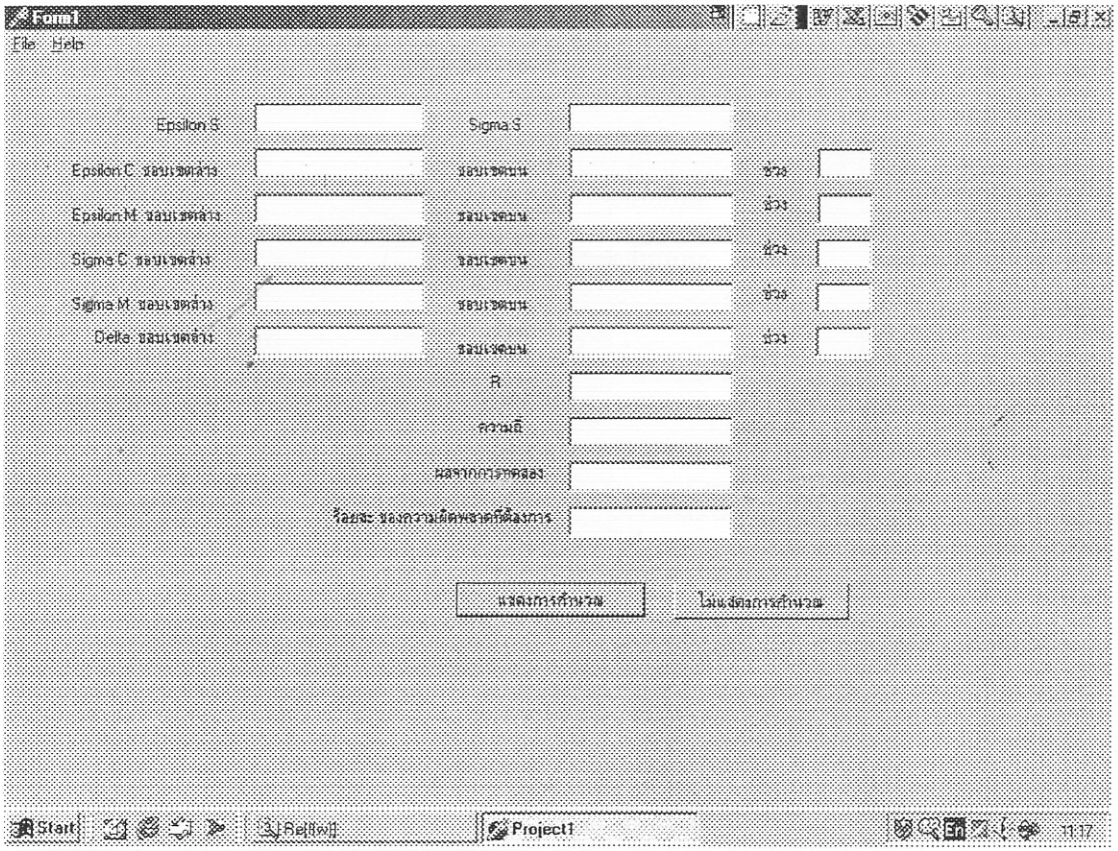
รูปประกอบที่ 7 อุปกรณ์วัดความเร็วไดอิเล็กโทรฟอเรติก (โทรทัศน์ และวีดีโอ)

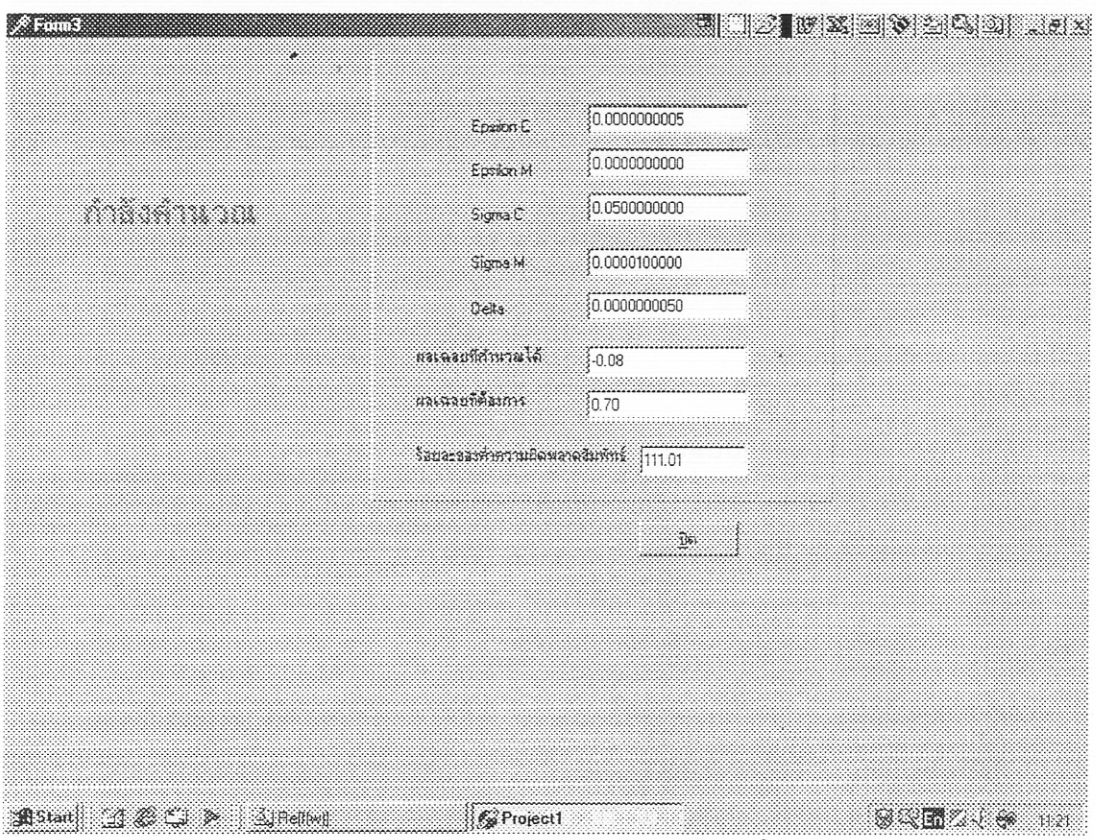
3.3 การเขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์คำนวณค่าไดอิเล็กทริกตามแบบจำลองทางไฟฟ้าของเซลล์

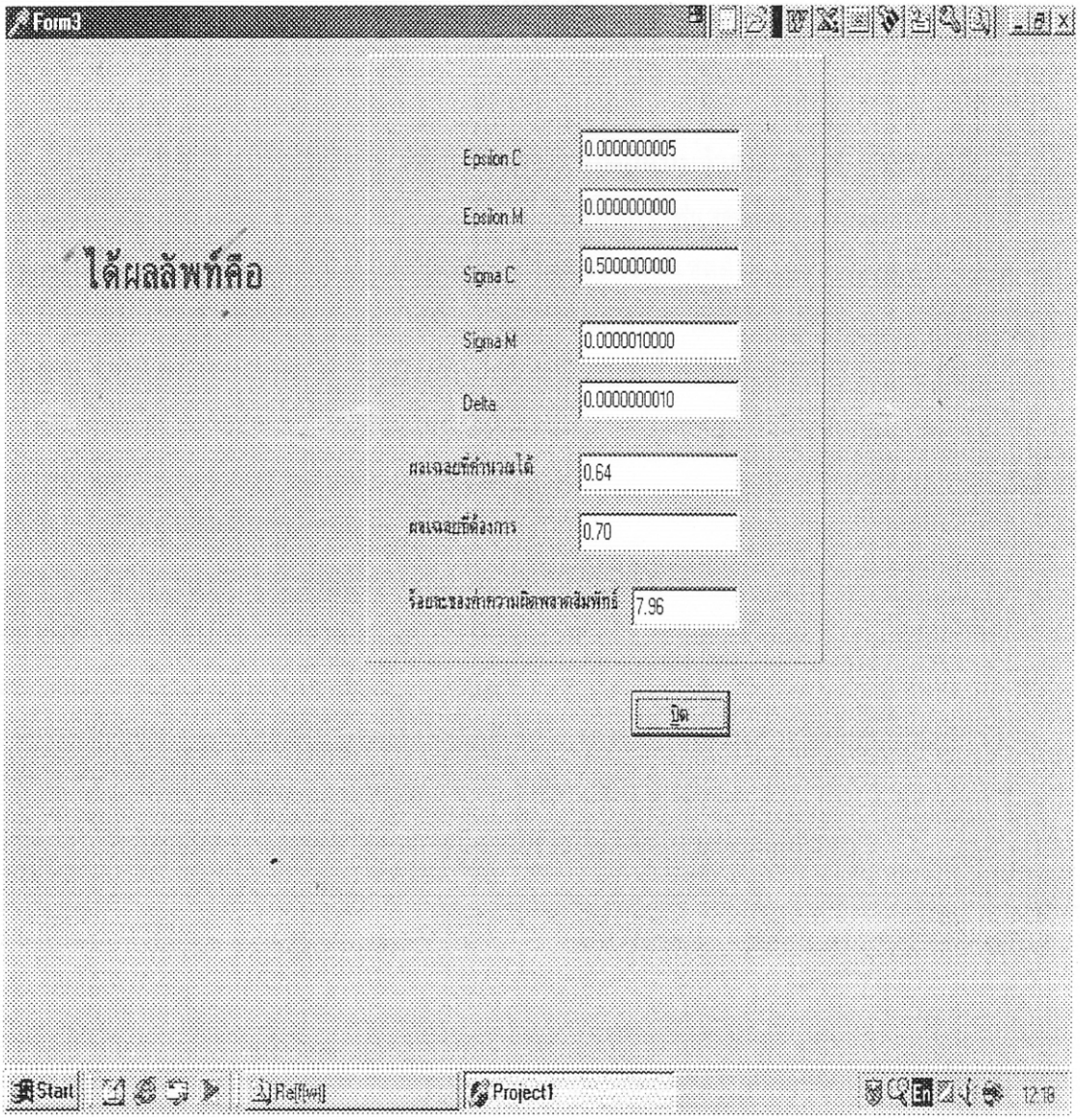
นำสมการที่ 4 เขียนในโปรแกรม Clipper เวอร์ชั่น 5.0 ใช้ PC ที่มี CPU ตั้งแต่ 486 ขึ้นไป เพื่อคำนวณค่าสภาพนำไฟฟ้าและสภาพยอมของโพรโทพลาสต์สับปะรดภูเก็ต ตามแบบจำลองทางไฟฟ้าเซลล์เดี่ยวทรงกลมบนไมโครคอมพิวเตอร์โดยใช้กระบวนการทำซ้ำจากค่าเริ่มต้นกำหนดช่วงความผิดพลาดเพื่อจำกัดผลเฉลยของสมการที่ 4 เมื่อกระบวนการทำซ้ำเสร็จสิ้นจะปรากฏค่าพารามิเตอร์ที่ต้องการหาเป็นตัวเลข ตามรูปประกอบที่ 8



รูปประกอบที่ 8 แสดงผลการคำนวณค่าไดอิเล็กทริกและค่าต่างๆตามแบบจำลอง SSM สามารถใส่ข้อมูลผลการทดลองได้ถึง 20 ข้อมูล วิเคราะห์ผลเป็นช่วงสเปคตรัมของ Re[f(w)] ได้ โดยใช้โปรแกรม Clipper เขียนโดยคณะวิจัยนี้จนเป็นที่สำเร็จ


Form1
File Help
Epsilon S
Sigma S
Epsilon C ของเหลว
ของแข็ง
ช่วง
Epsilon M ของเหลว
ของแข็ง
ช่วง
Sigma C ของเหลว
ของแข็ง
ช่วง
Sigma M ของเหลว
ของแข็ง
ช่วง
Delta ของเหลว
ของแข็ง
ช่วง
R
ความดี
ผลจากการทดลอง
ร้อยละ ของความผิดพลาดที่ต้องการ
แสดงการคำนวณ
ไม่แสดงการคำนวณ
Start
Project1
11:17


Form3
คำนวณค่าความ
Epsilon C
0.0000000005
Epsilon M
0.0000000000
Sigma C
0.0500000000
Sigma M
0.0000100000
Delta
0.0000000050
ผลเฉลยที่คำนวณได้
-0.08
ผลเฉลยที่ต้องการ
0.70
ร้อยละของค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์
111.01
ปิด
Start
Project1
11:21



รูปประกอบที่ 9 แสดงโปรแกรมคำนวณค่าไดอิเล็กทริกตามแบบจำลอง SSM แบบวิธีกำหนดค่า Re[f(w)] ค่าเดียว โดยใช้โปรแกรมเดลฟิ (สรวุฒิและเจษฎา ,2542) ด้วยวิธีกำหนดค่าพารามิเตอร์เริ่มต้นตามทฤษฎีแบบจำลองไฟฟ้า SSM จากนั้นกำหนดรัศมีเซลล์ และความถี่สนามไฟฟ้าพร้อมทั้งใส่ข้อมูลผลการทดลองและกำหนดเปอร์เซนต์ความคลาดเคลื่อนระหว่างผลการทดลองกับทฤษฎี เมื่อกดปุ่มเริ่มคำนวณปล่อยให้คอมพิวเตอร์ทำงานสักพัก(ประมาณ 5 นาที) จนได้ผลลัพธ์ จะปรากฏค่าไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้ารวมทั้งพารามิเตอร์ต่าง ๆตามแบบจำลอง SSM ที่หน้าจอตามรูปประกอบสุดท้าย (ระยะเวลาที่ใช้ในการคำนวณขึ้นกับการกำหนดเปอร์เซนต์ความคลาดเคลื่อนระหว่างผลการทดลองกับทฤษฎีรวมทั้งการกำหนดค่าพารามิเตอร์เริ่มต้น)