บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

ในการวิจัยเพื่อศึกษาการหมุนของโพรโทพลาสต์และเซลล์เม็ดเลือดแดงในสนามไฟฟ้ากระแสสลับได้แบ่งวิธีดำเนินการออกเป็น6 ขั้นตอนดังนี้

ตอนที่ 1 เตรียมโพรโทพลาสต์ *Lillium longiflorum* , *Dendrobium* sp. และ เซลล์เม็ดเลือดแดง

ตอนที่ 2 ศึกษาสภาพของสารละลายที่เหมาะสมต่อการแขวนลอยเซลล์

ตอนที่ 3 เหนี่ยวนำเซลล์ในสนามไฟฟ้าด้วยขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว

ตอนที่ 4 พัฒนาอุปกรณ์การทดลองแบบ 4 ขั้ว

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของการเหนี่ยวนำภายใต้เงื่อนไข สภาพนำไฟฟ้า ความเข้มสนามไฟฟ้า

ตอนที่ 6 วิเคราะห์ผลและประมาณค่าคงที่ทางไฟฟ้าที่เป็นไปได้ของเซลล์

ทุกขั้นตอนจะมีวัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัสดุที่ใช้เพาะเลี้ยง *Dendrobium* sp. และ*Lillium longflorum*

1) *Dendrobium* sp. และได้จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์
2) อาหารสำหรับใช้เลี้ยงต้นกล้วยไม้*Dendrobium* sp สูตร VW (ภาคผนวก)
3) อาหารสำหรับใช้เลี้ยงต้น *Lillium longflorum* สูตร BDS (ภาคผนวก)
4) โพรโทพลาสต์ *Ananas sp.* ได้จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

3.1.2 วัสดุสำหรับแยกและแขวนลอยโพรโทพลาสต์

1) เอนไซม์ Cellulase Onozuka – R10 (Yakult Honsha Co.ltd.)
2) เอนไซม์ Driselase (Kyowa Hakko Koqyo Co.ltd.)
3) เอนไซม์ Marcerozyme – R10 (Yakult Honsha Co.ltd.)
4) แมนนิทอล (D-mannitol ; Fluka Biochemika)

5) สารละลายเกลือโพแตสเซียมคลอไรด์(KCl) สำหรับปรับค่าสภาพนำไฟฟ้าของสารละที่ใช้แขวนลอยเซลล์
6) กรดไฮโดรคลอริก(HCl) สำหรับปรับค่า pH
7) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) สำหรับปรับ pH
8) แอลกอฮอล์ 95 %

3.1.3 วัสดุสำหรับแขวนลอยเซลล์เม็ดเลือดแดง

1) ซูโครส
2) MOPS (3-[N-Morpholino]propane-sulfonic acid) (Sigma Chemical Co.)
3) NaOH

3.1.4 เซลล์เม็ดเลือดแดง

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์สำหรับการเพาะ *Dendrobium* sp. และ*Lillium longflorum*.

1) ตู้ไมโครเวฟ (Sharp)
2) ตู้ Laminar flow (รุ่น HS – 124)
3) ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์
4) หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (รุ่น MAC-60)
5) จานเพาะเชื้อ (Petri dish)สำหรับแยกต้นกล้า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.8 cm
6) เครื่องมือวัดความเข้มแสง (Lux Hitester รุ่น 3421)
7) มีดผ่าตัดเบอร์ 4
8) ปากคีบปลาย (Forcep)

3.2.2 อุปกรณ์สำหรับแยกและเตรียมโพรโทพลาสต์ก่อนการเหนี่ยวนำในสนามไฟฟ้า

1) หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml
2) หลอดดูดสาร (Pasteur pipette) พร้อมจุกยาง
3) ตะแกรงกรองชนิดไนลอน (Nylonmesh) ขนาดรู 141 μm. เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm
4) อุปกรณ์นับเซลล์ (Haemacytometer slide) พร้อมแผ่นปิดสไลด์
5) จานหลุม (Well plate) ชนิด 24 หลุม เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm. ลึก 2 cm
6) จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm
7) เครื่องเขย่า (Shaker ; Bench-Top Orbito รุ่น 012116)

8) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge ; IEC รุ่น HN-SII)

9) เครื่องกวนแบบให้ความร้อน (Hot plate with stirrer ; Heildph รุ่น MR3001)

10) เครื่องชั่งสารระบบดิจิตอลแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Metter รุ่น PJ 400)

11) เครื่องวัดค่าสภาพนำไฟฟ้า (Tegracon 325 รุ่น LF 318)

12) เครื่องวัดค่า pH

13) กล้องจุลทัศน์ แบบประกอบ (Olympus รุ่น CHA)

3.2.3 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาด้วยไฟฟ้ากระแสสลับ

1) กล้องจุลทัศน์แบบหัวกลับ(Olympus รุ่น LH50A) กำลังขยายสูงสุด 600 เท่า สำหรับสังเกตการทดลอง

2) สายโคแอกเชียล รุ่น RQ-58ALV หัวต่อแบบ M-BNC

3) เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ (Function generator Stanford Research System รุ่น DS 345 มีช่วงความถี่ระหว่าง 1 Hz ถึง 30 MHz ความต่างศักย์สูงสุด 10 V_{P-P}

4) ลวดนิกเกิลอัลลอยด์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 μm. ค่าความต้านทานเชิงผิว 1,000 โอห์มต่อนิ้วฟุต (บริษัท California Fine Wire) พร้อมด้วยอุปกรณ์สำหรับทำขั้วไฟฟ้า

5) อุปกรณ์ปรับเลื่อนละเอียด (Micromanipulator)

6) เครื่องออสซิลโลสโคป 2 ช่องสัญญาณ (Hameg รุ่น HM 303)

7) เครื่องออสซิลโลสโคป 4 ช่องสัญญาณ

8) โทรทัศน์สีขนาด 27 นิ้ว (Sony รุ่น KV-K25MZI)

9) เครื่องเล่นวีดีโอ (Sony รุ่น SL V-K872)

10) จอภาพขนาด 14 นิ้ว (Sony PVM-1453MD)

11) กล้องถ่ายวีดีโอแบบ ดิจิตอล (Digital Video Camera Sony)

12) ไมโครโฟน

13) นาฬิกาจับเวลา (Casio)

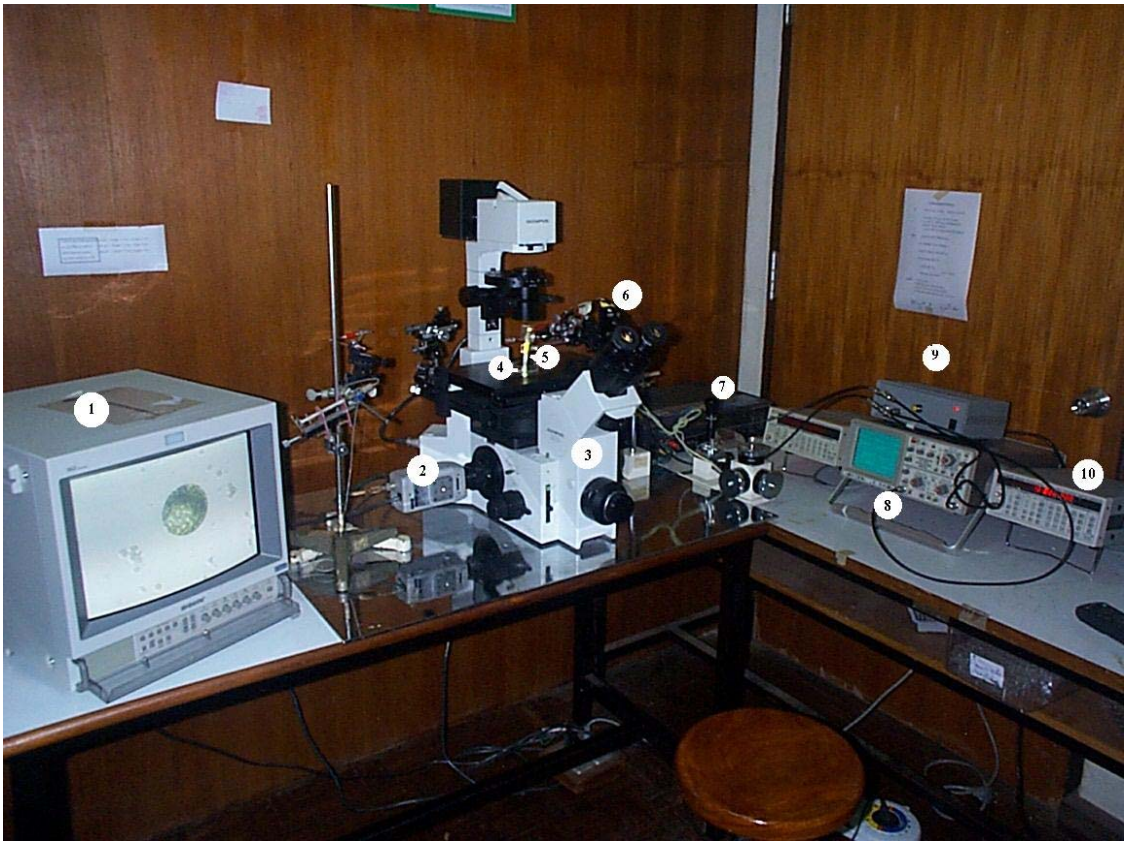
14) หลอดแก้วคาปิลารี

15) Variable power supply (ภาควิชาฟิสิกส์)

16) ชุดอุปกรณ์ดึงลวด (ภาควิชาฟิสิกส์)

17) Phase Shift Unit สำหรับแปลงสัญญาณจาก เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ เป็น 4 ช่องสัญญาณและมี เฟสต่างกัน 90^0 (สร้างขึ้นเอง)

18) ม้วน วีดีโอ สำหรับบันทึกภาพขณะทำการทดลอง(Sony รุ่น E-180DXE) ความยาว 180 นาที



ภาพประกอบ 3.1 ชุดอุปกรณ์การทดลองการเหนี่ยวนำเซลล์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ ประกอบด้วย 1)จอภาพ 2) กล้อง วีดีโอ 3)กล้องจุลทัศน์แบบหัวกลับ 4)เซลล์ขณะทำการทดลองบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อ 5) ขั้วไฟฟ้า 6)อุปกรณ์ปรับเลื่อนละเอียด 7)เครื่องเล่นและบันทึกภาพวีดีโอ 8)ออสซิลโลสโคป 9) PSU 10) เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ

19) TV Tuner สำหรับนำภาพจากวีดีโอเข้าเครื่องไมโครคอมพิวเตอร์

20) กรรไกร

21) กระดาษทราย

22) คลอโรฟอร์ม

3.2.4 อุปกรณ์สำหรับสร้าง Phase shift unit

1) ไอซี เบอร์ 7410

2) ไอซี เบอร์

3) ตัวเก็บประจุ

4) ตัวต้านทาน

5) ทรานซิสเตอร์

6) ไดโอด

7) สวิตช์

8) หลอดไฟ

9) สายไฟ

10) หัวต่อสายไฟ

11) หม้อแปลง

12) ตัวต้านทานแบบปรับค่าได้

13) แผ่นทองแดงสำหรับทำวงจร

14) กล่องพลาสติก

3.2.5 อุปกรณ์สำหรับประมวนผล

1) ไมโครคอมพิวเตอร์

2) โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel, Microsoft Word

3) เครื่องพิมพ์

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

1) โพรโทพลาสต์ของ *Lillium longiflorum* และ *Dendrobium* sp.

เตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง *Lillium longiflorum* คืออาหาร สูตร BDS(ภาคผนวก 2) ใช้เพาะเลี้ยง *Dendrobium* sp. คือ อาหารสูตร VW(ภาคผนวก 1) โดยเตรียมใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิด ขนาด 4 ounce(1 ounce = 28.41 ml) ใส่อาหารขวดละ 5 ml เสร็จแล้วอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C เป็นเวลา 20 นาที นำต้นพันธุ์ของ *Lillium longiflorum* และ *Dendrobium* sp. แยกต้นอ่อนลงเพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่มีความเข้มแสง 2,000 lux และอุณหภูมิ 25^{0}C รอจนอายุได้ประมาณ 1 เดือน หรือมีใบเจริญเติบโตพอจึงนำมาย่อยเอาโพรโทพลาสต์ได้

ตาราง 1 สูตรเอนไซม์สำหรับย่อยโพรโทพลาสต์จากใบกล้วยไม้และลิลลี่

	Dendrobium sp.	*Lillium longiflorum*.
เซลลูเลส	2%	1%
ไดรซิเลส	1%	1%
มาเซเรอไซม์	0.5%	0.5%

สำหรับการการย่อยโพรโทพลาสต์ ของ *Lillium longiflorum*. และ *Dendrobium* sp. นั้นย่อยโดยใช้เอนไซม์แยกเป็น 2 สูตรดังตาราง 1(วิธีการเตรียมดูตามภาคผนวก) เริ่มจากนำใบของ *Lillium longiflorum* หรือ *Dendrobium* sp. ที่ต้องการย่อยเอาโพรโทพลาสต์มาตัดปลายออกทั้งสองข้างแช่ในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 0.8 M เป็นเวลา 10 นาทีให้โพรโทพลาสต์เหี่ยวตัวเพื่อง่ายต่อการย่อยผนังเซลล์ออก เสร็จแล้วใช้มีดผ่าตัดหั่นตามขวางเป็นชิ้นเล็กบางขนาด 0.2 mm – 0.5 mm ก่อนนำไปแช่ในเอนไซม์ โดยใช้ใบไม้ 1 กรัม ต่อเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้ทึบแสง อุณหภูมิ 30 ^{0}C พร้อมเขย่าด้วยอัตรา 50 ครั้งต่อนาที โดยลิลลี่ใช้เวลา 2 – 2.5 ชั่วโมง ส่วนกล้วยไม้ใช้เวลา 3 – 3.5 ชั่วโมง (กนกกานต์,2542) เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำไปกรองแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นโพรโทพลาสต์โดยใช้ตะแกรงขนาด 141 μm แล้วแยกขยะออกอีกครั้งโดยใช้วิธี เกรเดียนท์ เดนซิตี้ (ภาคผนวก 2) เสร็จแล้วนำโพรโทพลาสต์ที่ได้แขวนลอยในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอล เพื่อใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแขวนลอยเซลล์และทดลองเหนี่ยวนำเซลล์ต่อไป

2) **เซลล์เม็ดเลือดแดง** เจาะเลือดด้วยเข็มปลายแหลมที่ฆ่าเชื้อ แล้วแขวนลอยในสารละลายที่มีส่วนผสมของ Sucrose 0.2 M, NaOH 1 mM, และ MOPS 1 mM สภาพนำไฟฟ้า 0.16 mS.m^{-1} และ 0.20 mS.m^{-1} (ปรับค่าสภาพนำไฟฟ้าโดยใช้สารละลาย KCL) pH = 5.67 (ปรับค่า pH โดยใช้สารละลาย HCL และ NaOH)เพื่อใช้สำหรับทดลอง เช่นเดียวกับโพรโทพลาสต์ของ *Dendrobium* sp. และ *Lillium longflorum*

3) **โพรโทพลาสต์ของ** *Ananas sp.*ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำโพรโทพลาสต์ที่ได้แขวนลอยในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 0.5 M สภาพนำไฟฟ้า 0.16 mS.m^{-1} เพื่อใช้ในการทดลอง

3.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายสำหรับแขวนลอยเซลล์

เนื่องจากในการทดลองเหนี่ยวนำเซลล์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับนั้นเซลล์ต้องแขวนลอยในสารละลายที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงทำให้ความดันภายในและภายนอกเซลล์มีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกันเพื่อไม่ให้เซลล์ที่แขวนลอยเกิดการแตกและเหี่ยวโดยมีวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

1) โพรโทพลาสต์

เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมในการแขวนลอยของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp.นั้นใช้สารละลายแมนนิทอลเข้มข้น 0.5 M (กนกกานต์,2542) ดังนั้นสำหรับการทดลองกับโพรโทพลาสต์ *Lillium longiflorum*. จึงสุ่มใช้ค่าความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกันคือ 0.3 M 0.4 M 0.5 M 0.6 M และ 0.7 M โดยนำโพรโทพลาสต์ของ *Lillium longiflorum* ที่ได้จากการเตรียมตามข้อ 3.3.1 แขวนลอยในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลที่มีค่าความเข้มข้นดังกล่าว ซึ่งบรรจุอยู่ในจานหลุมขนาดปริมาตร 1 ml แล้วนับจำนวนของโพรโทพลาสต์ในแต่ละความเข้มข้นโดยใช้อุปกรณ์นับเซลล์ เพื่อคำนวณค่าความหนาแน่นของจำนวนโพรโทพลาสต์ในสารละลายแต่ละค่าโดยใช้สมการตามภาคผนวก(2) หลังจากนั้นนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่ยังยังเป็นปกติ เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง 2.5 ชั่วโมง 5 ชั่วโมง และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ เขียนกราฟเปรียบเทียบจำนวนโพรโทพลาสต์ที่คำนวณได้เทียบกับเวลา(นำมาเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นที่ใช้แขวนลอย เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม) พิจารณาจากแนวโน้มการลดลงของจำนวนโพรโทพลาสต์ รวมทั้งคำนวณค่าร้อยละของโพรโทพลาสต์ที่เหลือที่เวลา 10 ชั่วโมง เงื่อนไขที่เซลล์เหลือมากที่สุดและผิดปกติน้อยที่สุดจะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้แขวนลอย

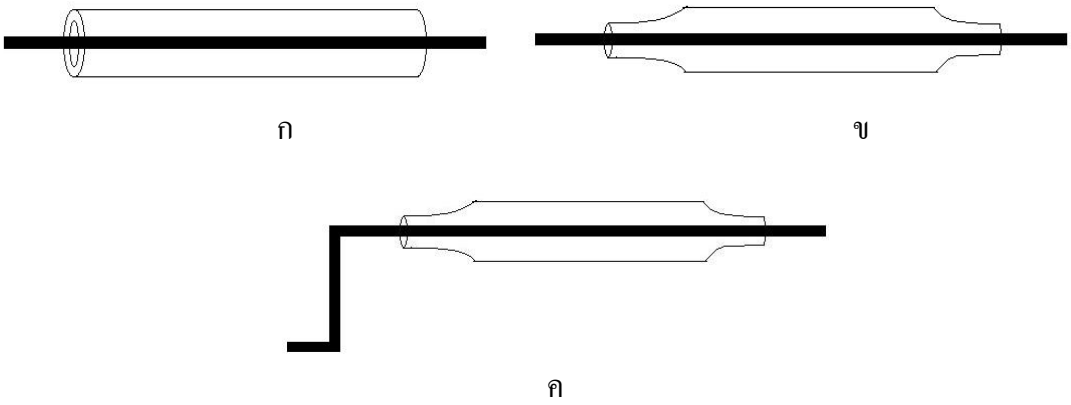
2) เซลล์เม็ดเลือดแดง

แขวนลอยเซลล์เม็ดเลือดแดงในสารละลายตามที่ระบุในหัวข้อ 3.3.1 โดยมี MOPS เป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์(โดยการทดลองค่าความเข้มข้นของ MOPS และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้คงที่คือ 1 mM)ปรับค่าความเข้มข้นของซูโครสเป็นที่ 0.1 M 0.2 M 0.3 M และ 0.4 M เพื่อหาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมในทำนองเดียวกับการทดลองกับโพรโทพลาสต์ของ *Lillium longiflorum*

3.3.3 การเหนี่ยวนำเซลล์ในสนามไฟฟ้าด้วยขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว

1) การเตรียมขั้วไฟฟ้าสำหรับใช้ในการเหนี่ยวนำแบบ 2 ขั้ว

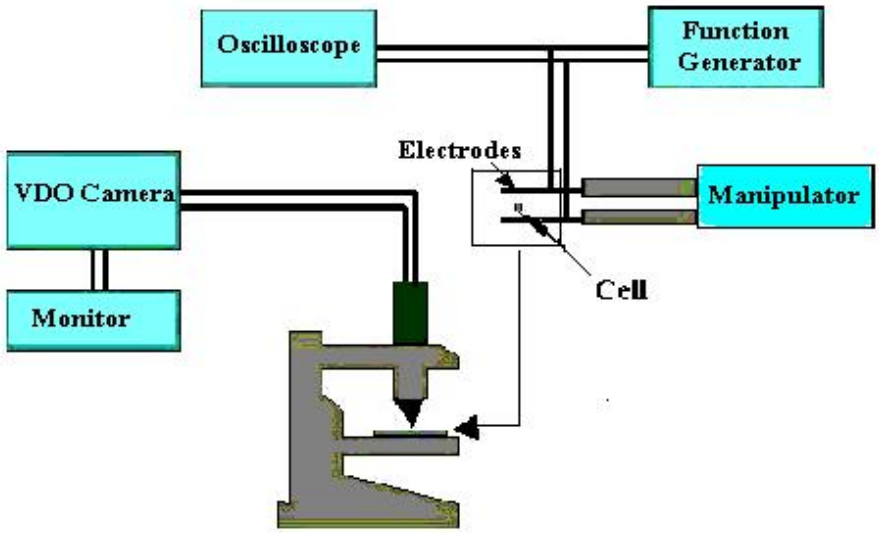
ใช้ลวดนิกเกิลอัลลอยด์ ทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 μm ความยาว 15 cm สอดไว้ในหลอดแก้วคาปิลารี ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm ดึงให้ตรงด้วยอุปกรณ์สำหรับดึงเส้นลวด ที่ทำขึ้นโดย ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งต่ออยู่กับอุปกรณ์จ่ายกระแสไฟฟ้าที่ปรับค่าได้เพื่อให้เกิดความร้อนขึ้นในเส้นลวด หยุดจ่ายสัญญาณไฟฟ้าใช้ไฟเผาหลอดแก้วที่ปลายทั้งสองด้าน ให้หลอมติดกับเส้นลวดเพื่อให้ขั้วไฟฟ้ามีความมั่น ดังภาพประกอบ 3.2 ก และ 3.2 ข จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ได้มาดัดให้เป็นรูปตัว L ดังภาพประกอบ 3.2 ค สำหรับการทดลองหนึ่งครั้งต้องเตรียมขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว



ภาพประกอบ 3.2 ก) ลวดนิกเกิลอัลลอยด์หลังจากดึงให้ตรงสอดอยู่ในหลอดแก้วคาปิลารี ข) หลังจากใช้ไฟเผาปลายทั้งสองด้านของหลอดแก้ว จะหลอมจนติดกับเส้นลวด เพื่อป้องกันให้ลวดไม่สามารถขยับไปมา ค) ขั้วไฟฟ้าที่เตรียมเสร็จแล้ว

2) การทดลองการเหนี่ยวนำแบบ 2 ขั้ว

เตรียมอุปกรณ์สำหรับเหนี่ยวนำเซลล์โดยจัดอุปกรณ์ดังภาพประกอบ 3.3 (กนก กานต์, 2542) ต่อสายสัญญาณจากอุปกรณ์กำเนิดสัญญาณไฟฟ้า ที่สามารถปรับ แอมพลิจูด 0 – 10 V_{P-P} ปรับความถี่ได้ 0 –30 MHz ไปยังขั้วไฟฟ้าที่ติดอยู่กับอุปกรณ์ปรับเลื่อนละเอียด (Manipulator) และขั้วไฟฟ้าจุ่มในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 0.6 M สภาพนำไฟฟ้า 0.096 $mS.m^{-1}$ ที่บรรจุในจานหลุมขนาด 5 ml ที่มีโพรโทพลาสต์ของ *Liliumlongiflorum* , แขวนลอยอยู่โดยสังเกตผ่านกล้องจุลทัศน์แบบหัวกลับ ที่ต่อเชื่อมอยู่กับกล้องบันทึกภาพวีดีโอ สำหรับบันทึกภาพที่ได้จากการทดลองไว้เป็น วีดีโอเทป และส่งภาพไปยังจอภาพเพื่อให้สังเกตการทดลอง



ภาพประกอบ 3.3 ไดอะแกรมแสดงอุปกรณ์สำหรับการทดลองเหนี่ยวนำเซลล์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับแบบ 2 ขั้วไฟฟ้า

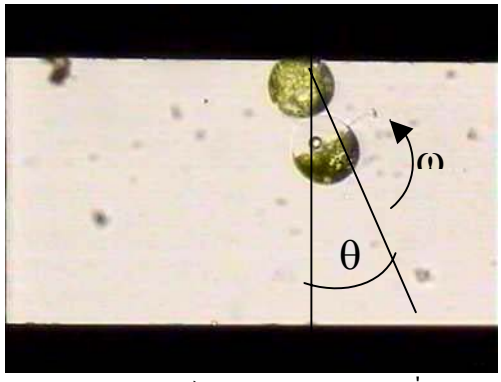
นำขั้วไฟฟ้าที่เตรียมไว้ติดตั้งกับอุปกรณ์ปรับเลื่อนละเอียด ต่อสายไฟไปยัง สวิตช์ที่ติดอยู่กับเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ ปรับขั้วไฟฟ้าทั้งสองให้ขนานกันและอยู่ในระนาบเดียวกัน วางห่างกัน 250 μm จากนั้นจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสองลงใน จานหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm ที่มีโพรโทพลาสต์ของ *Liliumlongiflorum,* ขนาด 50 μm. แขวนลอยอยู่ในสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้น 0.6 M สภาพนำไฟฟ้า 0.096 $mS.m^{-1}$ โดยให้มีโพรโทพลาสต์ของลิลลี่อยู่ระหว่างขั้วไฟฟ้าทั้งสองจำนวนสองเซลล์ เสร็จแล้วเปิดสวิตช์ เพื่อปล่อยสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับแบบคลื่นไซด์ (Sine wave) ดังภาพประกอบ 17 จากเครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสสลับไปยังขั้วไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 3 V_{P-P} ความถี่ 1 MHz. เพื่อให้โพรโทพลาสต์ทั้งสองเกาะกันและเคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วไฟฟ้า ตามทฤษฎีแรงไดอิเล็กโทรฟอรีซิส (Dielectrophoresis force)

เริ่มการทดลองที่ความถี่ 30 MHz แล้วลดความถี่ลงไปเรื่อยๆ จนถึง 1 Hz สังเกตการหมุนของเซลล์ ผ่านกล้องจุลทัศน์แบบหัวกลับ และบันทึกภาพไว้ด้วยกล้อง วีดีโอดิจิทอล เพื่อใช้หาความถี่เชิงมุมของการหมุนของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ต่างๆ โดยสมการ (36)

$$f = \frac{\text{จำนวนรอบ}}{\text{เวลา}} \tag{35}$$

$$\Omega = 2\pi f \tag{36}$$

เมื่อ f คือ ความถี่ของการหมุนของโพรโทพลาสต์(หน่วยเป็น $round.s^{-1}$ หรือ Hz)



ภาพประกอบ 3.4 การจัดเรียงตัวของโพรโทพลาสต์ขณะทำการทดลองเหนี่ยวนำแบบ 2 ขั้วโดยขั้วไฟฟ้าวางห่างกัน 250 μm. (โพรโทพลาสต์ของ *Liliumlongiflorum* ขนาด 50 μm แขวนลอยอยู่ในสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.6 M สภาพนำไฟฟ้า 0.160 $mS.m^{-1}$ ความต่างศักย์ 2.5 V_{P-P} ความถี่ 100 kHz)

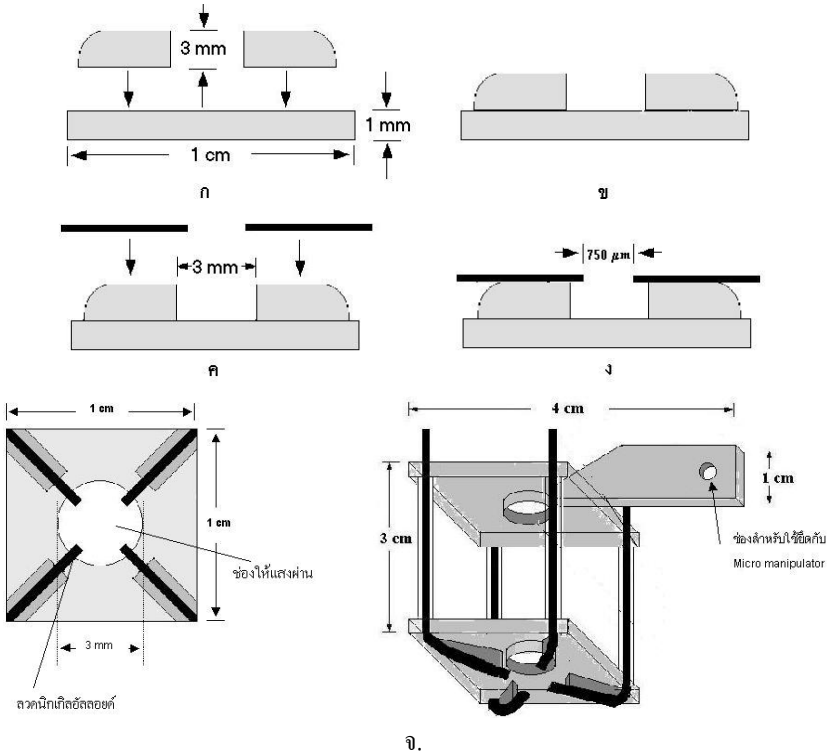
นำค่าความเร็วเชิงมุมที่ได้เขียนกราฟ เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ของสนามไฟฟ้าที่ใช้เหนี่ยวนำกับ ความถี่เชิงมุมการหมุนของโพรโทพลาสต์สำหรับวิเคราะห์ว่าความถี่ของสนามไฟฟ้ามีผลต่อเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวำนอย่างไร จากนั้นทดลองเพื่อเปรียบค่าความเข้มของสนามไฟฟ้าซึ่งกำหนดได้โดยให้ค่าความต่างศักย์เป็น 3.0 V_{P-P} และ 3.5 V_{P-P} เพื่อสังเกตผลของความเข้มสนามไฟฟ้าต่อการหมุนของเซลล์ และสุดท้ายทดลองโดยการเปรียบเทียบค่าสภาพนำไฟฟ้าเป็น 0.16 $mS.m^{-1}$,0.20 $mS.m^{-1}$

เปลี่ยนโพรโทพลาสต์เป็นของ *Dendrobium* sp. ที่มีขนาด 50 μm แล้วทดลองในเงื่อนไขเดียวกับ *Lillium longiflorum* เพื่อเปรียบเทียบความถี่เชิงมุมของการหมุนสำหรับเซลล์ต่างชนิดกัน

3.3.4 การเหนี่ยวนำเซลล์ในสนามไฟฟ้าด้วยขั้วไฟฟ้า แบบ 4 ขั้วระนาบวงกลม

1) การเตรียมขั้วไฟฟ้าสำหรับใช้ในการเหนี่ยวนำแบบ 4 ขั้ว

ตัดแผ่นพลาสติกใสที่มีความหนา 2 mm. เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด กว้างด้านละ 1 cm.เจาะรูตรงกลางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm.ใช้พลาสติกติดตรงมุมทั้ง 4 ดังภาพประกอบ 17.ก และ 17.ข ติดโดยใช้กาวตราช้างและคลอโรฟอร์มนำลวดนิกเกิลอัลลอยด์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 μm. ที่ตัดปลายให้ตั้งฉากกับแนวยาวของลวดติดบนแผ่นพลาสติกที่เตรียมไว้ ภาพประกอบ 17 ค โดยใช้กาวตราช้าติดให้ขั้วไฟฟ้าตั้งฉากกันพอดีทั้ง 4 สี่ขั้ว ระยะห่างกัน 750 μm. แล้วจึงนำไปติดกับฐานที่มีความสูง 3 cm. ดังภาพประกอบ 3.5 โดยใช้หลอดแก้วคาปิลารีสำหรับเป็นขาสี่ขาและเป็นปลอกของขั้วไฟฟ้านิกเกิลอัลลอยด์ ซึ่งยึดติดอยู่กับขาที่ทำจากแผ่นพลาสติกสำหรับติดตั้งกับอุปกรณ์ปรับเลื่อนละเอียด



ภาพประกอบ 3.5 ขั้นตอนการเตรียมขั้วไฟฟ้า ก และ ข ลักษณะและขนาดของแผ่นพลาสติกที่ใช้เป็นฐานและตรึงขั้วไฟฟ้า ค และ ง นำลวดนิกเกิลอัลลอยด์ที่เตรียมไว้ติดลงไปบนฐานที่เตรียมไว้ จ).ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการทดลองแบบ 4 ขั้วการทดลองเหนี่ยวนำในสนามไฟฟ้าเมื่อเตรียมเสร็จเรียบร้อย

2) การสร้าง PSU

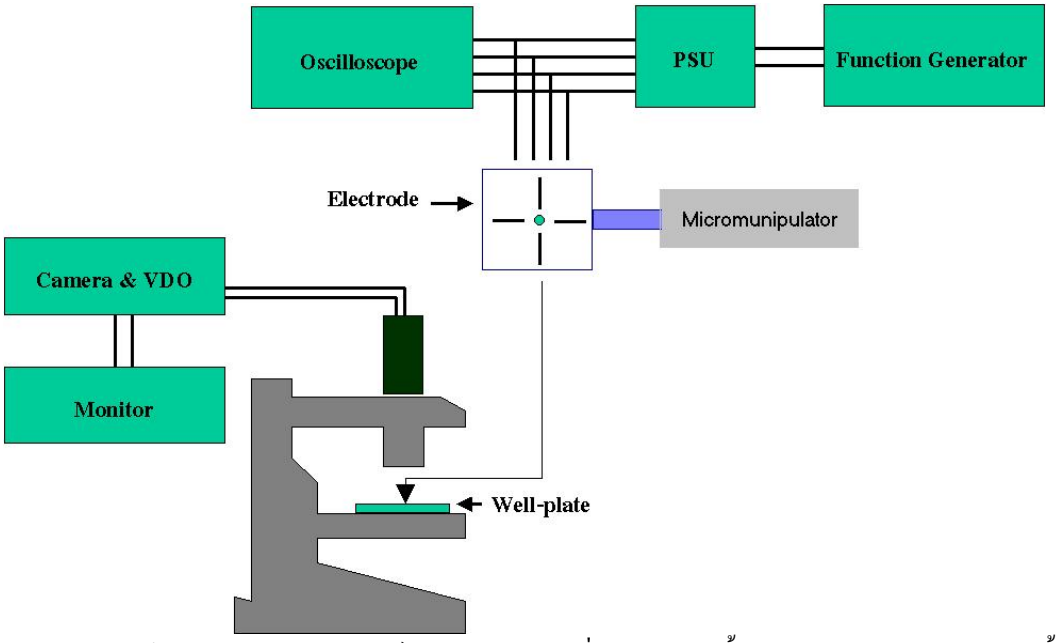
PSU เป็นอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นเพื่อแปลงสัญญาณไฟฟ้าเป็น 4 ช่องสัญญาณที่มีเฟสต่างกัน 90^0 เพื่อสร้างสนามไฟฟ้าหมุนโดยรายละเอียดจะอยู่ในบทที่ 4 หัวข้อ 4.3.2 หัวข้อย่อย 1) การพัฒนาอุปกรณ์เพื่อใช้กำเนิดสนามไฟฟ้าหมุน

3) การทดลองการเหนี่ยวในสนามไฟฟ้ากระแสสลับแบบ 4 ขั้ว

การทดลองแบบ 4 ขั้วยังใช้อุปกรณ์หลักเช่นเดียวกับการทดลองแบบ 2 ขั้วจะต่างกันที่มี PSU เพิ่มเข้ามาเพื่อทำหน้าทำสัญญาณไฟฟ้าให้เป็นแบบ 4 ช่อง สัญญาณ ที่มีเฟสต่างกัน 90^0 (Out of phase) และลักษณะของขั้วไฟฟ้าซึ่งเปลี่ยนไปดังแสดงในหัวข้อ 3.3.4.1 โดยจัดอุปกรณ์ตามภาพประกอบ 3.6 และหย่อนขั้วไฟฟ้าทั้ง 4 ลงในจานหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm ที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดง อยู่ตรงกึ่งกลาง ซึ่งทดลองในสารละลายน้ำตาลซูโครส 0.2 M สภาพนำไฟฟ้า 0.096 $mS.m^{-1}$ โดยเริ่มทดลองที่ค่าความต่างศักย์ 3.2 V_{P-P} ความถี่ 6 MHz (เป็นค่าความถี่สูงสุด ที่ PSU ทำงานได้อย่างถูก

ต้อง ดูรายละเอียดในหัวข้อ 4.3.2 การทดสอบ PSU) แล้วลดความถี่ลงไปเรื่อยสังเกตการหมุนของเซลล์เม็ดเลือดแดงบันทึกบันทึกภาพด้วยกล้องวีดีโอเพื่อใช้คำนวณค่าความถี่เชิงมุมของเซลล์เม็ดเลือดแดง สำหรับนำไปเขียนกราฟดูความสัมพันธ์ของ Ω กับ f ของสนามไฟฟ้า เพื่อใช้หาค่าคงที่ K ที่เป็นลักษณะและชนิดของวัสดุที่ใช้ทำขั้วไฟฟ้า เนื่องเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ที่ทราบค่าคงที่ทางไฟฟ้า

เปลี่ยนค่าความเข้มสนามไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 5.0 V_{P-P} กับ 6.0 V_{P-P} เพื่อสังเกตผลกระทบที่เกิดจากความเข้มสนามไฟฟ้าที่ใช้เหนี่ยวนำ แล้วจึงเปลี่ยนสภาพนำไฟฟ้า เป็น 0.16 $mS.m^{-1}$ กับ 0.20 $mS.m^{-1}$ เพื่อศึกษาผลกระทบจากสภาพนำไฟฟ้าของสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันจากนั้นเปลี่ยนตัวอย่างที่ศึกษาเป็นโพรโทพลาสต์เพื่อศึกษาค่าคงที่ทางไฟฟ้าของโพรโทพลาสต์เปรียบเทียบกับการทดลองแบบ 2 ขั้ว



ภาพประกอบ 3.6 ไดอะแกรมแสดงอุปกรณ์การทดลองการเหนี่ยวนำแบบ 4 ขั้ว(โดยรวมจะเหมือนกับแบบ 2 ขั้ว แต่จะมี PSU เพิ่มเข้ามาเพราะเป็นอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่ แยกสัญญาณออกเป็นสี่ช่องสัญญาณเพื่อจ่ายให้กับขั้วไฟฟ้าทั้งสี่ โดย PSU นี้เป็นอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นเอง)