การเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ

The Deformation of *Dendrobium* sp. Protoplasts in AC Electric Fields

กนกกานต์ มาศวิวัฒน์

Kanokkan Maswiwat

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Physics

Prince of Songkla University

2543

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium sp.* ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ

ผู้เขียน นางสาว กนกกานต์ มาศวิวัฒน์

สาขาวิชา ฟิสิกส์

ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

โพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. เตรียมได้จากสารละลายเอนไซม์ผสมของ Cellulase 2% Driselase 1% และ Marcerozyme 0.5% ซึ่งละลายในน้ำตาลแมนนิทอล 0.7 kmol.m^{-3} ใช้เวลาในการย่อยผนังเซลล์ 4 ชั่วโมง เมื่อทดลองกับสนามไฟฟ้าแขวนลอยโพรโทพลาสต์ในสารละลายแมนนิทอล ที่มีค่าความดันออสโมติกประมาณ 1.24 MPa เหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์ระหว่างขั้วไฟฟ้าทรงกระบอกขนานโดยเปลี่ยนสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย 3 ค่า คือ 1 mS.m^{-1},10 mS.m^{-1} และ 20 mS.m^{-1} พบที่สนามไฟฟ้า 17 kV.m^{-1} โพรโทพลาสต์เกาะขั้วไฟฟ้าที่ความถี่ระหว่าง 3 kHz ถึง 15 MHz และขอบเขตความถี่ต่ำจะเพิ่มขึ้นเป็น 5 kHz เมื่อใช้กลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่นประมาณ 2 x10^{4} per ml นอกจากนี้พบว่าความถี่ขอบเขตต่ำเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้า หรือสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย ส่วนขอบเขตความถี่สูงเท่ากับขีดจำกัดของเครื่องมือคือ 15 MHz ทุกกรณีที่ศึกษา เมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น 45 kV.m^{-1} และ 60 kV.m^{-1} ทั้งโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์จะยืดก่อนเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้า

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้า ได้ยืดโพรโทพลาสต์ให้เกาะขั้วไฟฟ้า โดยใช้ความถี่ 1 MHz สนามไฟฟ้าขนาด 17 kV.m^{-1} แล้วเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น 30 kV.m^{-1}, 45 kV.m^{-1} , 60 kV.m^{-1} ถึง 85 kV.m^{-1} พบว่าโพรโทพลาสต์มีความยืดหยุ่นตามกฎของฮุค (Hooke's Law) ระหว่างความถี่ 0.5 MHz ถึง 10 MHz โพรโทพลาสต์ยืดได้สูงสุดหลังจากเหนี่ยวนำนาน 2 นาที เวลาที่ยืดได้สูงสุดนี้ไม่ขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้า มีข้อสังเกตว่าที่ความถี่ต่ำ (0.5 MHz) และสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายสูง (20 mS.m^{-1}) การยืดของโพรโทพลาสต์เกิดขึ้น 2 จังหวะ ที่ทุกค่าสนามไฟฟ้าที่ทดลอง สัดส่วนการยืดของครึ่งแกนเอกและครึ่งแกนโท (a/b) เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของสนามไฟฟ้า ส่วนความถี่จะมีผลต่อการยืดอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มสนามไฟฟ้าสูงกว่า 45 kV.m^{-1} นอกจากนี้เมื่อเพิ่มสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายจาก 1 mS.m^{-1} เป็น 20 mS.m^{-1} และให้สนามไฟฟ้าคงที่ 85 kV.m^{-1} พบว่าความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์ยืดได้สูงสุดจะเปลี่ยนจาก 1 MHz (a/b=1.46$\pm$0.02) เป็น 5 MHz (a/b=1.37$\pm$0.01)

ในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้า 10 mS.m^{-1} และให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าระหว่างเวลา 3 นาที ถึง 20 นาที ที่ความเข้มสนามต่ำกว่า 85 kV.m^{-1} พบว่าเวลาในการคืนรูปคงที่

(14.7±0.6 s) ไม่ขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้า โดยการเพิ่มเวลาจาก 3 นาที ถึง 20 นาที ไม่มีผลต่อการคืนรูป และหากให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าเป็นเวลา 1 นาที เวลาในการคืนรูปจะสั้นกว่า (10.0±0.1 s) อย่างไรก็ดีหากใช้สนามไฟฟ้า 85 $kV.m^{-1}$ นานเกิน 5 นาที โพรโทพลาสต์จะไม่คืนรูป หรือเกิดการรั่วบริเวณผิวด้านตรงกันข้ามกับผิวที่สัมผัสขั้วไฟฟ้า นอกจากนี้หากใช้ความถี่ต่ำกว่าความถี่ขอบต่ำของสเปคตรัมไดอิเล็กโทรฟอเรติกโพรโทพลาสต์จะแตกเสมอ เมื่ออาศัยทฤษฎีแรงดึงทางไฟฟ้าของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว พบว่าค่าคงที่ของการยืดหยุ่น (K) และค่ายังมอดูลัส (Y) โดยประมาณคือ 0.037±0.011 $mN.m^{-1}$ และ 1.38±0.15 $N.m^{-2}$ ตามลำดับ

เมื่อศึกษาผลของสนามไฟฟ้าต่อการดูดซึมฟอสเฟต โดยใช้ไอโซโทปรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ โพรโทพลาสต์ที่ถูกเหนี่ยวนำในสนามไฟฟ้าขนาด 17 $kV.m^{-1}$ นาน 3 นาที พบว่าการดูดซึมฟอสเฟตไม่ต่างจากชุดควบคุม แต่ลดลงเมื่อความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น 45 $kV.m^{-1}$ และ 60 $kV.m^{-1}$ เมื่อตรวจสอบการมีชีวิตของกลุ่มโพรโทพลาสต์ด้วยสารเรืองแสง FDA พบว่าเมื่อให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าขนาด 45 $kV.m^{-1}$ และ 60 $kV.m^{-1}$ นาน 3 นาที เปอร์เซนต์การมีชีวิตเป็น 89% และ 70% ตามลำดับ และเปอร์เซนต์การมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ลดลงเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้านานขึ้น แสดงให้เห็นว่าความเข้มสนามไฟฟ้าสูงและเวลาที่ให้เซลล์อยู่ในสนามไฟฟ้านานเกินไปจะทำให้เปอร์เซนต์การตายของโพรโทพลาสต์เกิดขึ้นได้สูง จึงสรุปว่าการดูดซึมฟอสเฟตที่ลดลงในสนามไฟฟ้าและเวลาของการเหนี่ยวนำสูงเกิดจากโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตลดจำนวนลง

งานวิจัยนี้ให้ข้อคิดว่าหากจะใช้สนามไฟฟ้ากระแสสลับศึกษาโพรโทพลาสต์กล้วยไม้ *Dendrobium* sp. ควรคำนึงถึงความเข้มสนามไฟฟ้า ระยะเวลา และความถี่ที่ใช้ ค่าคงที่ของการยืดหยุ่นและค่ามอดูลัสที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางไฟฟ้าของโพรโทพลาสต์ชนิดนี้ และอาจนำไปใช้ในการบอกความผิดปกติของโพรโทพลาสต์ได้ นอกจากนี้อาจเป็นประโยชน์ในการเปิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ การรวมเซลล์ และการทำให้เซลล์แตกตัว

Thesis Title	The Deformation of *Dendrobium* sp. Protoplasts in AC Electric Fields
Author	Miss Kanokkan Maswiwat
Major Program	Physics
Academic Year	1999

Abstract

Dendrobium sp. protoplasts were prepared by dissolving 2% Cellulase , 1% Driselase and 0.5% Marcerozyme in 0.7 kmol.m^{-3} mannitol. Cell wall was digested after 4 hours in the enzyme composition. The protoplasts were suspended in mannitol solution of 1.24 MPa osmotic pressure under were used in 1 mS.m^{-1}, 10 mS.m^{-1}and 20 mS.m^{-1} conductivity, before being induced in between a pair of cylindrical electrodes. Under 17 kV.m^{-1} field strength, a protoplast was interacted with the electrodes at frequency between 3 kHz and 15 kHz. The lower boundary was increased to 5 kHz when protoplasts of 2 x10^{4} per ml were induced. Moreover, the lower boundary of the spectrum increased with the field strength or solution conductivity. In all cases the upper boundary at 15 MHz was fixed due to the limit of the function generator used. When the field strength was increased to 45 kV.m^{-1} and 60 kV.m^{-1}, the induced protoplasts elongated before moving towards the electrodes.

To investigate the deformation of the protoplasts in electric fields, a protoplast was brought into contact with one electrode, using 1 MHz frequency and 17 kV.m^{-1} field strength. The field was then increased to 30 kV.m^{-1} , 45 kV.m^{-1} , 60 kV.m^{-1} and 85 kV.m^{-1}. The result showed that protoplasts behaved according to Hooke' s Law at frequency between 0.5 MHz and 10 MHz. Time taken for maximum elongation occurred after 2 minutes in the applied field, regardless of field strength . Noted that at low frequency (0.5 MHz) and under high conductivity (20 mS.m^{-1}), protoplasts showed two elongation phases, appearing in every field strength used in this study. Elongation ratio of semi-major and semi-minor (a/b) was increased with the field strength. The frequency influenced explicitly on the ratio if field strength was greater than 45 kV.m^{-1}. When solution conductivity was increased from 1 mS.m^{-1} to 20 mS.m^{-1} under constant 85 kV.m^{-1} field strength, maximum elongation ratio was shifted from 1 MHz (a/b=1.46$\pm$0.02). to 5 MHz (a/b=1.37$\pm$0.01).

Under solution conductivity and field strength of 10 $mS.m^{-1}$ and 85 $kV.m^{-1}$, protoplasts exposed to the field between 3 minutes and 20 minutes showed constant restoring time (14.7±0.6 s), independently from field strength. The restoring time was shorter (10±0.1 s) when field exposured time was 1 minute. When protoplasts were exposed to 85 $kV.m^{-1}$ field strength for more than 5 minutes, a failure in restoring or leakage were observed. The leakage occurred on the membrane surface opposite to the electrode. It was observed that protoplasts were always broken if the frequency was lower than the lower boundary of dielectrophoretic spectrum. According to single spherical shell model , elongation constant (K) and Young's modulus (Y) were estimated to be about 0.037±0.011 $mN.m^{-1}$ and 1.38±0.15 $N.m^{-2}$, respectively.

Effect of AC electric fields on phosphate uptake was studied by using radioisotope of $NH_4H_2{}^{32}PO_4$. Protoplasts exposed to 17 $kV.m^{-1}$ field strength for 3 minutes showed no difference in the uptake compared to the control, whereas those exposed to 45 $kV.m^{-1}$ and 60 $kV.m^{-1}$ reduced in the uptake. In separate experiment with FDA, viability of protoplasts was tested using 45 $kV.m^{-1}$ and 60 $kV.m^{-1}$ field strength. Viability percentage of 3 minutes field exposed protoplasts was 89% and 70%, respectively, and the percentage was reduced with the longer exposure time. The result showed that high field strength and longer period of exposure time lead to higher percentage of cell death. It was concluded that reduced phosphate uptake in high field strength under longer field exposure time was due to reduction of protoplasts viability.

This work suggests that are studied in AC electric field on *Dendrobium* sp. protoplasts, field strength, field exposure time and the frequency used are essential parameters. Elongation constant and Young's modulus provide fundamental electrical information for the protoplasts and may be used as an indicator for protoplasts abnormality. Furthermore, the information may be useful for electroporation, cell fusion and cell fission.