

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

ตัวอย่างอมีบา

Amoeba proteus สายพันธุ์ P_{DA} จากสต็อก (stock) ของ รศ.ดร.เจิงชัย ต้นสกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งได้รับจาก Dr. M. J. Ord University of Southampton ประเทศอังกฤษ เมื่อเดือนเมษายน 2539

สารเคมี

1. สารเคมีใช้ทดสอบความเป็นพิษ
 - แนนพทาลีน
2. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์
 - Neutral Red (Fluka)
3. สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงอมีบา
 - NaCl
 - NaHCO₃
 - KCl
 - Na₂HPO₄·12H₂O
 - CaHPO₄
 - MgCl₂
4. สารเคมีที่ใช้ปรับ pH ของอาหาร
 - NaOH
 - HCl
5. สารเคมีที่ใช้ล้างอุปกรณ์
 - น้ำยาทำความสะอาดเอนกประสงค์ทีโพล (TEEPOL) (เซลล์แห่งประเทศไทย)

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกใส ขนาด 11 x 11 x 6 เซนติเมตร³
- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร
- ปีเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- กระจกชีดียา
- หลอดหยดปลายยาว
- สายยาง (rubber tubing) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร
- สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
- กระดาษอลูมิเนียม (Aluminium foil)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (OLYMPUS Model SZ-ST)
- กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ (OLYMPUS Model CH 30)
- กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ (OLYMPUS Model PV300)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer Model hp 8435)
- pH - meter (PRION Model SA 520)
- เตากวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Fisher Scientific)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Sartorius Model BP 210S)

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างอมิบา

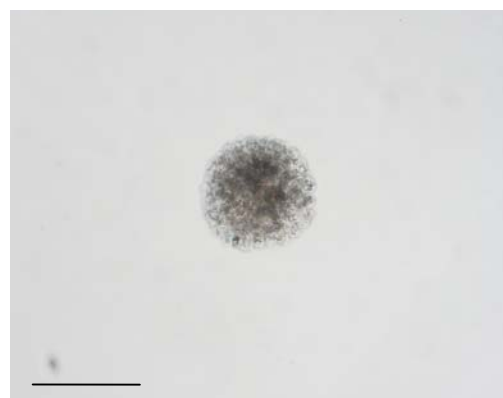
อมิบาในห้องปฏิบัติการเลี้ยงในกล่องพลาสติกใส ก่อนนำกล่องพลาสติกมาใช้ทุกครั้งต้องล้างด้วยน้ำยาที่โพลจนสะอาด จากนั้นปล่อยให้แห้งผ่านประภาณครึ่งชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำมาใช้ การล้างกล่องให้สะอาดเพื่อให้อมิบาสามารถเกาะผิวกล่องได้ การเลี้ยงอมิบาเริ่มโดยการต้มเมล็ดข้าวสาลีในน้ำกลั่นประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำเมล็ดข้าวสาลีที่ต้มแล้วจำนวน 1-2 เมล็ดมาใส่ในกล่องพลาสติกที่มี Modified Chalkley's medium

สูงประมาณ 1 เซนติเมตร (ปริมาตร 120 มิลลิลิตร) ที่ปรับให้มี pH 5.8 - 6.0 นำเมล็ดข้าวสาลีที่มีอมีบาเกาะอยู่จากกล่องสต็อกของภาควิชาชีววิทยาภาสไนในกล่องที่เตรียมไว้นี้ ตั้งทิ้งไว้ในห้องที่อุณหภูมิ 23 ± 1 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ อมีบาจะแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก (ปิยรัตน์, 2540)

อมีบาที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในระยะดิวิชัน สเฟียร์ (division sphere) เซลล์ในระยะนี้จะสังเกตได้ง่าย ลักษณะเป็นทรงกลมแตกต่างจากปกติอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 2 ก และ ข) และไม่เกาะกับพื้นกล่อง เซลล์ในระยะนี้จะแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสองภายในเวลาประมาณครึ่งชั่วโมง (รูปที่ 2 ค และ ง) หลังจากเซลล์แบ่งตัวแล้วประมาณ 3 ชั่วโมงจึงนำมาใช้ในการทดลอง (ดัดแปลงจาก Ord, 1970)



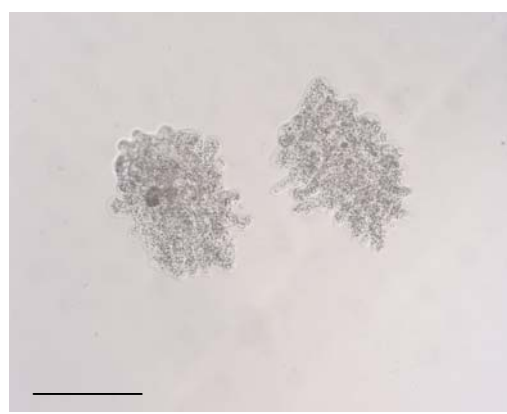
(ก)



(ข)



(ค)



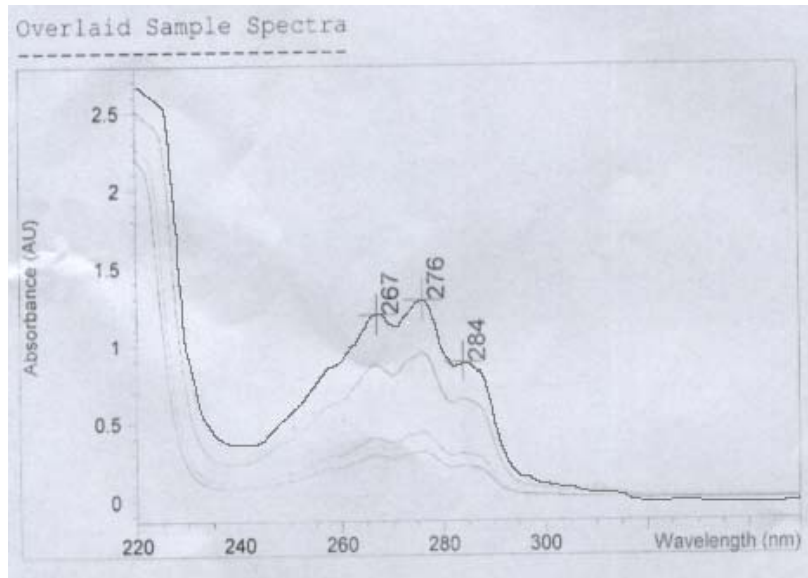
(ง)

รูปที่ 2 อมีบา (*A. proteus*) (ก) ในระยะปกติ (ข) ในระยะดิวิชัน สเฟียร์ (ค) กำลังแบ่งตัว (ง) หลังจากแบ่งตัวแล้ว ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ (bar = 100 ไมโครเมตร)

2. การเตรียมสารละลายแนฟทาลิน

เตรียมสารละลายที่จะใช้ในการทดลองในรูปที่ละลายน้ำ (Water Soluble Fraction : WSF) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Millemann *et al.* (1984) ละลายแนฟทาลินในอาหารที่ใช้เลี้ยงอมีบา โดยใส่ในขวดรูปชมพู่แล้วคนจนกระทั่งแนฟทาลินละลายหมดที่อุณหภูมิห้อง ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยกระดาษอลูมิเนียมเพื่อป้องกันการระเหยของแนฟทาลิน เมื่อต้องการเตรียมสารละลายในระดับความเข้มข้นที่ต้องการใช้ในการทดลองให้เติมอาหารที่ใช้เลี้ยงอมีบาลงไปเจือจางตามสัดส่วน

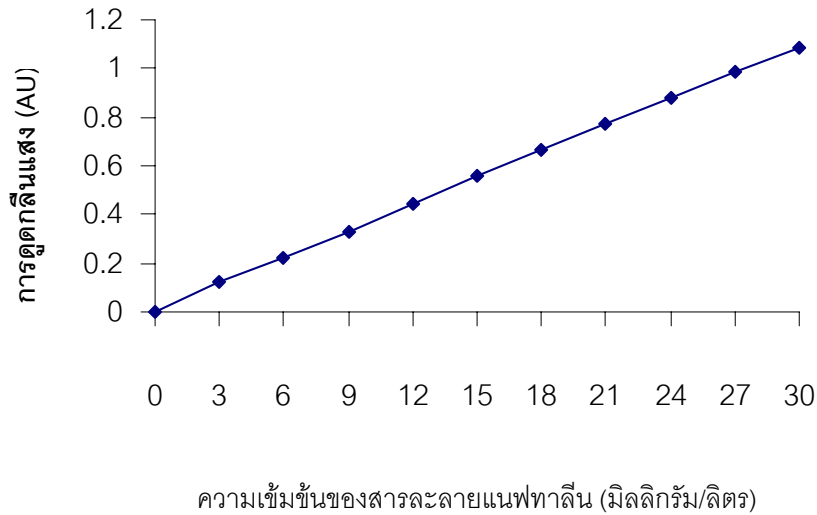
การหาความเข้มข้นของสารละลายแนฟทาลินใช้วิธีเส้นกราฟมาตรฐาน (ลาวัลย์, 2543) ดังนี้ เตรียมสารละลายมาตรฐานแนฟทาลิน ด้วยการชั่งสารแนฟทาลิน 30 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจำนวนหนึ่งจนกระทั่งแนฟทาลินละลายหมด เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานแนฟทาลินตั้งต้น 30 มิลลิกรัม/ลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐานแนฟทาลินให้มีความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 มิลลิกรัม/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานแนฟทาลินไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเลือกสารละลายมาตรฐานแนฟทาลินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/ลิตร ไปสแกนหาความยาวคลื่นในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเล็ต (รูปที่ 3) ได้ค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแนฟทาลินสูงสุดเท่ากับ 276 nm นำความยาวคลื่นที่ได้มาใช้สำหรับเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ หลังจากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแนฟทาลินความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 276 nm ได้ค่าการดูดกลืนแสงดังนี้ ที่ความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ค่าแอบซอเบแนนซ์ 0.00000, 0.12045, 0.22186, 0.32747, 0.44284, 0.55529, 0.66758, 0.77523, 0.87538, 0.98633 และ 1.08360 AU ตามลำดับ (ตารางที่ 1) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแนฟทาลินกับค่าการดูดกลืนแสงจะได้เส้นกราฟมาตรฐาน (Standard curve) (รูปที่ 4) ส่วนการหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่สภาวะเดียวกับสารละลายมาตรฐาน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างจากเส้นกราฟมาตรฐานต่อไป



รูปที่ 3 การดูดกลืนแสงของสารละลายแอฟทาลีนที่ความยาวคลื่นช่วงอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 1 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารละลายมาตรฐานแอฟทาลีน ที่ความยาวคลื่น 276 nm

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของสารละลายแอฟทาลีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (AU)
1	0	0.00000
2	3	0.12045
3	6	0.22186
4	9	0.32747
5	12	0.44284
6	15	0.55529
7	18	0.66758
8	21	0.77523
9	24	0.87538
10	27	0.98633
11	30	1.08360



รูปที่ 4 เส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแวนฟาตลิน ($r^2=0.99989$)

3. วิธีการทดลอง

3.1 ความเป็นพิษเฉียบพลันของแวนฟาตลินต่ออหิมา

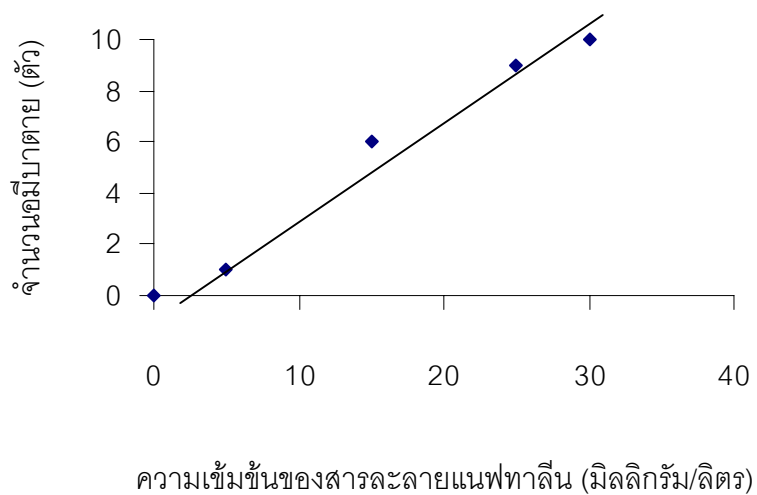
การทดลองเพื่อหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การทดลองขั้นต้น (Range - finding toxicity test) และการทดลองอย่างละเอียด (Short - term definitive test) (APHA, AWWA and WEF, 1998) มีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 การทดลองขั้นต้น

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของแวนฟาตลินที่มีผลต่ออหิมาในช่วงกว้าง โดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้อหิมิตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้อหิมามีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองเป็น 5 ระดับ คือที่ความเข้มข้น 0 (การทดลองควบคุม) 5, 15, 25 และ 30 มิลลิกรัม/ลิตร ระดับละ 10 ตัว โดยใส่สารละลายแวนฟาตลินความเข้มข้นที่กำหนดไว้ในจานเพาะเชื้อที่มีอหิมา ปิดฝาจานเพาะเชื้อเพื่อลดการระเหยของสารละลายแวนฟาตลิน บันทึกผลการตายของอหิมิตามเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองมีจำนวนการตายของอหิมิต่างนี้ ความเข้มข้นของสารละลายแวนฟาตลิน 0, 5, 15, 25 และ 30 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวนอหิมิตาย 0, 1, 5, 6 และ 10 ตัวตามลำดับ (ตารางที่ 2) นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแวนฟาตลินและจำนวนการตายของอหิมิตามเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 5) ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้อหิมิตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 28 มิลลิกรัม/ลิตร และความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้อหิมามีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายแวนฟาตลินที่จะใช้ในการทดลองขั้นที่ 2 คือ ช่วงระหว่าง 3 - 28 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางที่ 2 จำนวนการตายของอมีบาที่ได้รับสารละลายแอฟทาลีนความเข้มข้น 0 (การทดลองควบคุม), 5, 15, 25 และ 30 มิลลิกรัม/ลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (n = 10)

ความเข้มข้นของสารละลายแอฟทาลีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนอมีบาทั้งหมด (ตัว)	จำนวนอมีบาตาย (ตัว)
0	10	0
5	10	1
15	10	6
25	10	9
30	10	10



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแอฟทาลีนกับการตายของอมีบาที่เวลา 24 ชั่วโมง (n = 10)

3.1.2 การทดลองอย่างละเอียด

การทดลองเพื่อหาค่าความเป็นพิษของแอฟทาลีนโดยละเอียด โดยแบ่งความเข้มข้นของสารละลายแอฟทาลีนระหว่างความเข้มข้น 3 - 28 มิลลิกรัม/ลิตรออกเป็น 5 ระดับ คือความเข้มข้น 3, 10, 16, 22, และ 28 มิลลิกรัม/ลิตร และการทดลองควบคุม (0 มิลลิกรัม/ลิตร) ระดับละ 3 ซ้ำ ใช้มีบาซ้ำละ 10 ตัว ใส่สารละลายแอฟทาลีนตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ลงในจานเพาะเชื้อที่มีมีบา ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด และบันทึกผลการตายของมีบาที่เวลา 1.5 , 3 , 6 , 12 และ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับสาร

การตายของมีบาส่งเกตจากการแตกของเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาสซึมไหลออกสู่ภายนอก (Ord and Al-Atia, 1979) ในระหว่างทำการทดลองไม่มีการให้อาหาร และไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่ใช้ในการทดลอง

ข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณหาระดับความเป็นพิษเฉียบพลันที่เวลา 24 ชั่วโมง (24 h - LC₅₀) ใช้วิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท (probit analysis) ตามวิธีการของ Finney (1971) ซึ่งค่า 24 h - LC₅₀ ที่ได้จะเป็นความเข้มข้นที่นำไปศึกษาผลของแอฟทาลีนต่อไลโซโซมต่อไป

3.2 ผลของแอฟทาลีนต่อความเสถียรของเยื่อหุ้มไลโซโซม

แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม โดยใช้สารละลายแอฟทาลีนความเข้มข้นเท่ากับ 8.85 มิลลิกรัม/ลิตร (24 h - LC₅₀) ทำการทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำ ใช้มีบาซ้ำละ 10 ตัว อยู่ในสารละลายเป็นเวลา 0 (การทดลองควบคุม), 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Snyman, 2000) ตรวจสอบความเป็นพิษของแอฟทาลีนด้วยวิธี neutral red retention (ดัดแปลงจาก Lowe and Pipe, 1994) ดังนี้

- วางมีบาลงในจานเพาะเชื้อ ปล่อยทิ้งไว้ให้มียาเกาะพื้น ดูดเอา medium ออกให้เหลือน้อยที่สุด
- เจือจางสารละลาย neutral red ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ด้วย Modified Chalkley's medium (ในสัดส่วนสารละลาย neutral red ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ 0.01 มิลลิลิตรต่อ Modified Chalkley's medium 10 มิลลิลิตร)
- ใส่สารละลาย neutral red ที่เจือจางแล้วลงในจานเพาะเชื้อ 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 2 ชั่วโมง
- หลังจากนั้นดูดเอาสีส่วนเกินออกแล้วใส่ Modified Chalkley's medium ลงไปแทนที่

- ศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ สังเกตเห็นไลโซโซมมีสีแดง ในขณะที่ไซโตพลาสซึมไม่มีสี ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์มีบาทุก ๆ 15 นาที และสิ้นสุดการทดสอบเมื่อ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดมีไซโตพลาสซึมเป็นสีชมพู (เนื่องจากสี neutral red ไหลออกจากไลโซโซมสู่ไซโตพลาสซึม) และเวลาที่ใช้นี้ถือเป็นเวลา neutral red retention

เปรียบเทียบความแตกต่างของเวลา neutral red retention ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Scheffe

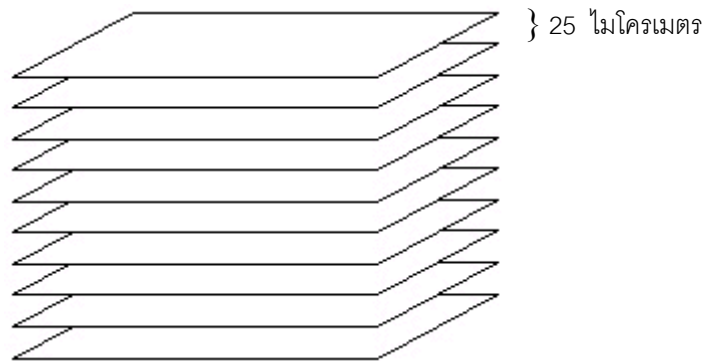
3.3 ผลของแนฟทาลีนต่อการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง ปริมาตร และจำนวนของไลโซโซม

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม โดยได้รับสารละลายแนฟทาลีนความเข้มข้นเท่ากับ 8.85 มิลลิกรัม/ลิตร (24 h - LC₅₀) ใช้มีบาในกลุ่มละ 10 ตัว อยู่ในสารละลายเป็นเวลา 0 (การทดลองควบคุม) 3 และ 12 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำมีบามาหย่อมด้วยสี neutral red ดังนี้

- วางมีบาในจานเพาะเชื้อ ปล่อยให้ให้มีบาเกาะพื้น ดูดเอา medium ออกให้เหลือน้อยที่สุด
- เจือจางสารละลาย neutral red ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ด้วย Modified Chalkley's medium (ในสัดส่วนสารละลาย neutral red ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ 0.01 มิลลิลิตร ต่อ Modified Chalkley's medium 15 มิลลิลิตร)
- ใส่สารละลาย neutral red ที่เจือจางแล้วลงในจานเพาะเชื้อ 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที
- หลังจากนั้นดูดเอาสีส่วนเกินออกแล้วใส่ Modified Chalkley's medium ลงไปแทนที่ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 10 นาที (ดัดแปลงจาก Allison and Young, 1964; Zdolsex *et al.*, 1990)
- ศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ⁿ บันทึกภาพตัวอย่างมีบาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ตัวอย่างละ 20 ภาพ โดยบันทึกภาพทุกระดับความลึกของตัวอย่าง 25 ไมโครเมตร (รูบที่ 6) นำภาพมาศึกษา

ⁿ ดูรายละเอียดภาคผนวกที่ 3

การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของไลโซโซม โดยวัด การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของไลโซโซมด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ ส่วนการคำนวณหาปริมาตรและจำนวน ของไลโซโซมใช้เทคนิคสเตอริโอโลยี ดังต่อไปนี้



รูปที่ 6 การบันทึกภาพตัวอย่างอมีบาทุกระดับความลึกของตัวอย่าง 25 ไมโครเมตร

ที่มา: www.plbio.ku/ak/~ais/confocal.html

3.3.1 การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของไลโซโซม ศึกษา ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์

เลือกบริเวณในการศึกษาการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของไลโซโซมโดยการสุ่มภาพด้วยวิธีจับฉลาก (อภิญา, 2531) จำนวน 5 ภาพจากตัวอย่าง อมีบาแต่ละตัว จากภาพแต่ละภาพสุ่มเลือกบริเวณที่จะศึกษา 3 บริเวณ ดังนั้น ตัวอย่างอมีบาแต่ละตัววัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 บริเวณ

3.3.1.1 การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์

วัดความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ในไลโซโซมและในไซโต-พลาสซึมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ และบันทึกผล

3.3.1.2 ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของไลโซโซม

วัดความยาวและความกว้างของไลโซโซม หลังจากนั้นคำนวณหาความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของไลโซโซมได้จากนำค่าความกว้างของไลโซโซมบวกความยาวของไลโซโซมและหารด้วยสอง (Domouhtsidou และ Dimitriadis., 2001)

3.3.2 ปริมาตรและจำนวนของไลโซโซม คำนวณโดยใช้เทคนิคเตอริโอโลยี

(Weibel *et al.*, 1966 อ้างโดย Tansakul, 1977)

บริเวณในการศึกษาปริมาตรและจำนวนของไลโซโซมได้จากการส่องภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ด้วยวิธีจับฉลาก 5 ภาพจากตัวอย่างอมีบา 1 ตัว และนำมาคำนวณหาปริมาตรและจำนวนของไลโซโซม ดังนี้

3.3.2.1 ปริมาตรของไลโซโซม

คำนวณหาปริมาตรของไลโซโซมโดยวาง lattice test point system ลงบนภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ นับจำนวนจุดของระบบทดสอบที่ตกลงบนไลโซโซม (P_i) (รูปที่ 7) และคำนวณหาปริมาตรของไลโซโซมได้จากความสัมพันธ์ของจำนวนจุดที่ตกลงบนไลโซโซมกับจำนวนจุดทั้งหมดของระบบทดสอบ

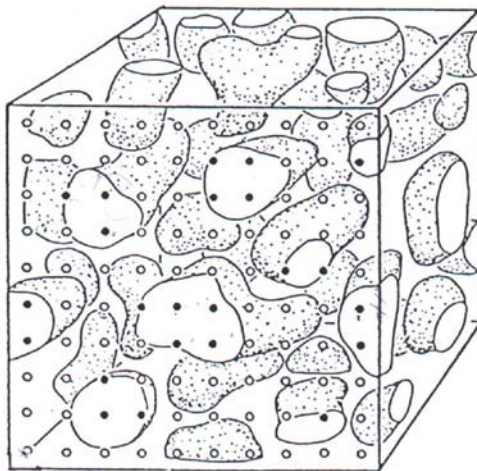
จะได้ว่า

$$V_{vi} = P_i / P_t$$

เมื่อ V_{vi} คือสัดส่วนของปริมาตร

P_i คือจำนวนจุดที่ตกลงบนไลโซโซม

P_t คือจำนวนจุดทั้งหมดของระบบทดสอบ



รูปที่ 7 ตัวอย่างการนับจำนวนจุดของระบบทดสอบที่ตกลงบนไลโซโซม

ที่มา: Weibel *et al.*, 1966 อ้างโดย Tansakul, 1977

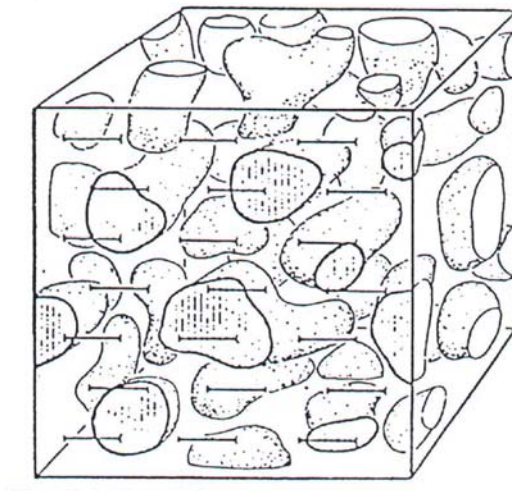
3.3.2.2 จำนวนของไลโซโซม

คำนวณหาจำนวนไลโซโซม (N_{vi}) โดยการวาง multipurpose test system ลงบนภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ นับจำนวนเส้นของระบบทดสอบที่ตัดกับไลโซโซม (N_{ai}) (รูปที่ 8) และคำนวณหาปริมาตรของไลโซโซมจากสมการ ดังนี้

$$N_{vi} = \frac{\beta^{-1} \cdot N_{ai}^{(3/2)}}{V_{vi}^{(1/2)}}$$

- เมื่อ N_{vi} คือ จำนวนไลโซโซมต่อปริมาตร
 N_{ai} คือ จำนวนของเส้นที่ตัดกับไลโซโซมต่อพื้นที่
 V_{vi} คือ สัดส่วนของปริมาตร
 β คือ dimensionless coefficient ของไลโซโซม

สำหรับโครงสร้างที่มีรูปร่างกลมค่า β เท่ากับ 1.38 (Au *et al.*, 1999)



รูปที่ 8 ตัวอย่างการนับจำนวนเส้นของระบบทดสอบที่ตัดกับไลโซโซม
ที่มา: Weibel *et al.*, 1966 อ้างโดย Tansakul, 1977

เปรียบเทียบความแตกต่างของความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง ความเข้มของการเรืองแสง ฟลูออเรสเซนซ์ภายในไลโซโซมและในไซโตพลาสซึม ปริมาตรและจำนวนของไลโซโซมในแต่ละกลุ่มการทดลอง ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Scheffe