รายงานการวิจัย
เรื่อง
ระบบวัดศักย์ไฟฟ้าในเซลล์พืช

A System for Electrical Potential Measurement in Plant Cells

โดย

นางพิกุล วณิชาภิชาติ
ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่

สมอ
QC541.T
5
พ62
2534

รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
ปีงบประมาณ 2533

บทคัดย่อ

ระบบวัดศักย์ไฟฟ้าในเซลล์พืชประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์ ตัวขยายสัญญาณ และตัวรับสัญญาณงานวิจัยนี้ได้นำส่วนประกอบทั้งสามมาต่อเข้าด้วยกัน พร้อมทั้งจัดทำระบบดักจับสัญญาณภายในเซลล์ กรองสัญญาณแทรก (Noise) ทดสอบการใช้งานโดยวัดศักย์ไฟฟ้าในเซลล์รากข้าว ได้ขนาด 130mV ±10mV แม้ว่าตัวรับสัญญาณมีสเกลค่อนข้างหยาบ แต่ผลที่วัดได้เป็นที่พอใจ

บทนำ

สัญญาณไฟฟ้าในเซลล์เป็นสื่อบอกความมีชีวิต ความสมบูรณ์ การตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมและกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในของเซลล์นั้น ๆ ระบบสำหรับวัดศักย์ไฟฟ้าภายในเซลล์จึงเป็นอุปกรณ์วัดที่สำคัญและจำเป็นต่อการศึกษาทางชีวฟิสิกส์ระดับเซลล์

ระบบวัดที่ประกอบขึ้นในห้องปฏิบัติการชีวฟิสิกส์นี้ อาศัยอุปกรณ์พื้นฐานเท่าที่มีอยู่ เช่น กล้องจุลทรรศน์ ตัวขยายสัญญาณ และตัวบันทึกสัญญาณ นำมาต่อเข้ากับตัวจับสัญญาณ ซึ่งในที่นี้คือไมโครอิเล็กโตรดบรรจุสารละลายเกลือ สัญญาณในระบบวัดนี้จึงประกอบด้วยส่วนที่เกิดจากไอออนภายในเซลล์และสัญญาณไฟฟ้าในลวดตัวนำ โดยอาศัยสะพานเกลือ (salt-bridge) และครึ่งเซลล์เป็นตัวแปลงสัญญาณ

ในการทดสอบการทำงานของระบบ ได้ใช้รากข้าวอายุ 3-5 วัน เป็นพืชทดลอง โดยการเพาะจากเมล็ดภายใต้การควบคุมแสงและอุณหภูมิ ผลการวัดเป็นที่พอใจ กล่าวคือ มีขนาดของศักย์ไฟฟ้าอยู่ในช่วงที่มีการศึกษาพบในพืชทั่ว ๆ ไป

วัสดุอุปกรณ์

1. <u>สารละลายเลี้ยงเซลล์</u>

สารละลายที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ สารละลายมาตรฐาน Hoagland มีค่า pH ประมาณ 5.4 เป็นสารละลายเลี้ยงเซลล์ขณะทดลอง

2. <u>ไมโครอิเล็กโทรด</u>

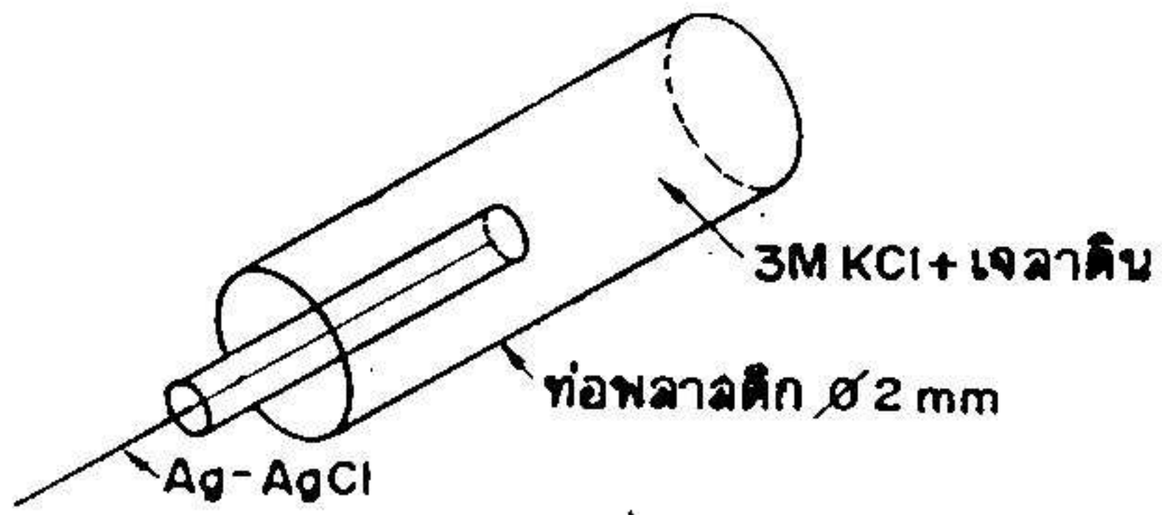
ใช้หลอดแก้วแคปิลลารี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 mm ยาว 100 mm ภายในมีเส้นใยแก้วกลม ๆ เล็ก ๆ ติดที่ขอบด้านหนึ่งตลอดความยาวของหลอดแก้ว แก้วแต่ละหลอดสามารถทำไมโครอิเล็กโทรดได้ 4 อัน แต่ละอันถูกดึงให้มีปลายแหลมขนาด 1-5 µm ด้วยเครื่องดึงยี่ห้อ Narishige รุ่น PE-2 No.7805

3. <u>สะพานเกลือ</u> (Salt-bridge)

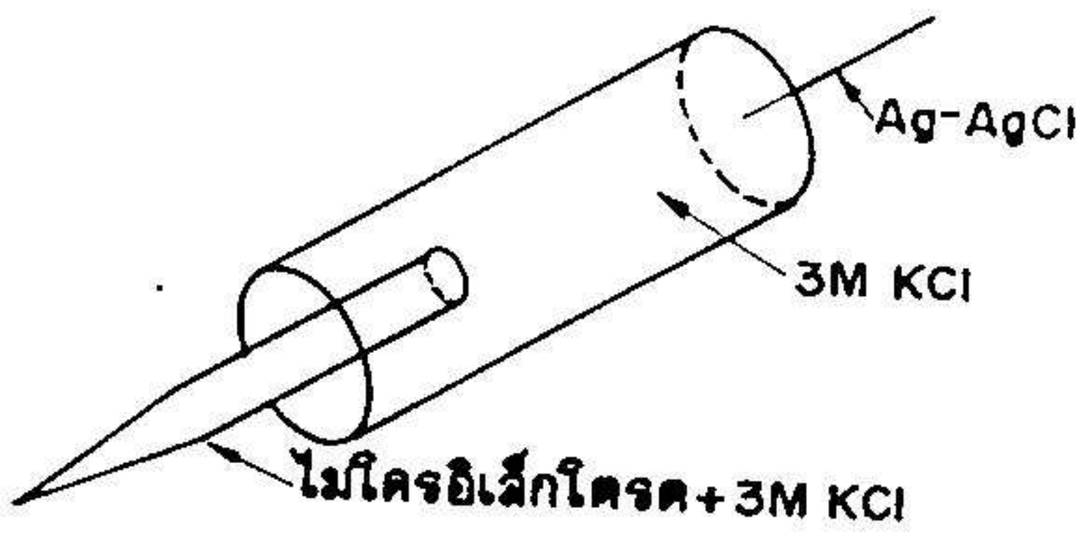
เตรียมสารละลายเกลือ KCl ความเข้มข้น 3M แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งสำหรับเติมในไมโครอิเล็กโตรด ส่วนที่สองผสมเจลาตินในปริมาณ 3% โดยน้ำหนัก ลงในสารละลายเกลือเพื่อให้เป็นวุ้น แล้วดูดเข้าไปเก็บในท่อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เมื่อเย็น สารละลายเกลือที่เป็นวุ้นจะแข็งตัวในท่อพลาสติก(ดูรูปที่ 1ก) เจลาตินจะช่วยให้ความต้านทานที่อิเล็กโตรดอ้างอิงคงที่ (Bingley, 1964) เพื่อเพิ่มอายุการใช้งานควรเก็บโดยจุ่มปลายทั้งสองของท่อพลาสติกในสารละลาย 3M KCl

4. <u>อิเล็กโตรดอ้างอิง</u>

เนื่องจากศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้ เป็นค่าที่เปรียบเทียบกับศักย์ภายนอกเซลล์ และเพื่อต่อให้ครบวงจร จึงจำเป็นต้องใช้อิเล็กโตรดอ้างอิงจุ่มในสารละลายที่เลี้ยงเซลล์ในการทดลอง อิเล็กโตรดนี้ประกอบด้วยครึ่งเซลล์ต่อกับสะพานเกลือในข้อ 3



(ก)



(ข)

รูปที่ 1 แสดงครึ่งเซลล์ที่อิเล็กโตรดอ้างอิง (ก) และครึ่งเซลล์ที่ไมโครอิเล็กโตรด (ข) ทั้งสองชิ้นนี้เรียก E (ดูรูปที่ 2)

5. <u>ครึ่งเซลล์</u> (Half-Cells)

ครึ่งเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 ชิ้น โดยครึ่งเซลล์แรกต่อกับไมโครอิเล็กโตรดที่ใช้แทงลงไปในเซลล์ ส่วนครึ่งเซลล์ที่สองจะต่อกับอิเล็กโตรดอ้างอิง ครึ่งเซลล์ทั้งสองนี้จะทำหน้าที่แปลงสัญญาณจากไอออนเป็นอิเล็กตรอน

การเตรียมครึ่งเซลล์ทำได้โดยใช้ลวดเงินบริสุทธิ์ 99.99% จุ่มลงในสารละลาย 0.1N HCℓ ซึ่งต่อเป็นวงจรกับแบตเตอรี 5 โวลต์ เป็นเวลา 5 นาที อนุมูล $Cℓ^-$ จะเคลือบบนลวดเงินจะได้ครึ่งเซลล์ชนิด Ag-AgCℓ ครึ่งเซลล์ที่เตรียมโดยวิธีนี้จะใช้กับอิเล็กโตรดอ้างอิงเท่านั้น ส่วนครึ่งเซลล์ที่ใช้กับไมโครอิเล็กโตรดเป็นชิ้นส่วนสำเร็จรูปของ Harvard Apparatus Ltd. รุ่น 5606 ทั้งนี้เพื่อเสียบเข้ากับเครื่องจับยึดในข้อ 6 ได้สะดวก ถึงแม้ครึ่งเซลล์ทั้งสองจะเป็นชนิดเดียวกันแต่โครงสร้างเชิงเรขาคณิตต่างกัน ทำให้ระบบวัดนี้มีความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่าง ขั้วบวก-ลบ อยู่จำนวนหนึ่ง การบันทึกค่าของศักย์ไฟฟ้าจะหักความต่างศักย์นี้ออกทุกครั้ง

6. **เครื่องจับยึดไมโครอิเล็กโตรด**

เนื่องจากไมโครอิเล็กโตรดมีขนาดเล็กและเปราะบาง ภายหลังจากการใส่สารละลายเกลือ 3M KCℓ แล้วปลายด้านบนจะเสียบไว้กับครึ่งเซลล์ ซึ่งติดกับเครื่องจับยึดไมโครอิเล็กโตรดโดยมีปุ่มปรับเพื่อสามารถเคลื่อนที่ได้ 3 ทิศทาง และมีสเกลบอกระยะทางที่ไมโครอิเล็กโตรดเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ ค่าละเอียดสุดของสเกล คือ 10 ไมครอน

7. **เครื่องขยายสัญญาณ**

เครื่องขยายสัญญาณที่ใช้เป็นของยี่ห้อ Palmer Bioscience Model 6312 มีปุ่มทดสอบความต้านทานของไมโครอิเล็กโตรด เนื่องจากปลายของไมโครอิเล็กโตรดมีขนาดเล็กเกินกำลังแยกของดวงตา ความต้านทานขนาด 10-40 MΩ เป็นตัวชี้ขนาดของไมโครอิเล็กโตรดที่ใช้งานในการทดลองนี้ ส่วนการเลือกกำลังขยายสัญญาณ และการทดสอบการทำงานของตัวขยายสัญญาณจะกระทำผ่านเครื่องออสซิลโลสโคป

8. **เครื่องบันทึกสัญญาณ**

สเกลของเครื่องบันทึกสัญญาณสามารถเลือกได้ 5 ช่วง อย่างไรก็ดีช่วงที่เหมาะสม คือ ขนาด 0.10 V/cm ซึ่งทำให้ค่าละเอียดสุดของการวัด คือ ±10 mV เครื่องบันทึกสัญญาณที่ใช้เป็น Y-T Recorder ยี่ห้อ Houston Instrument Model B5216-2

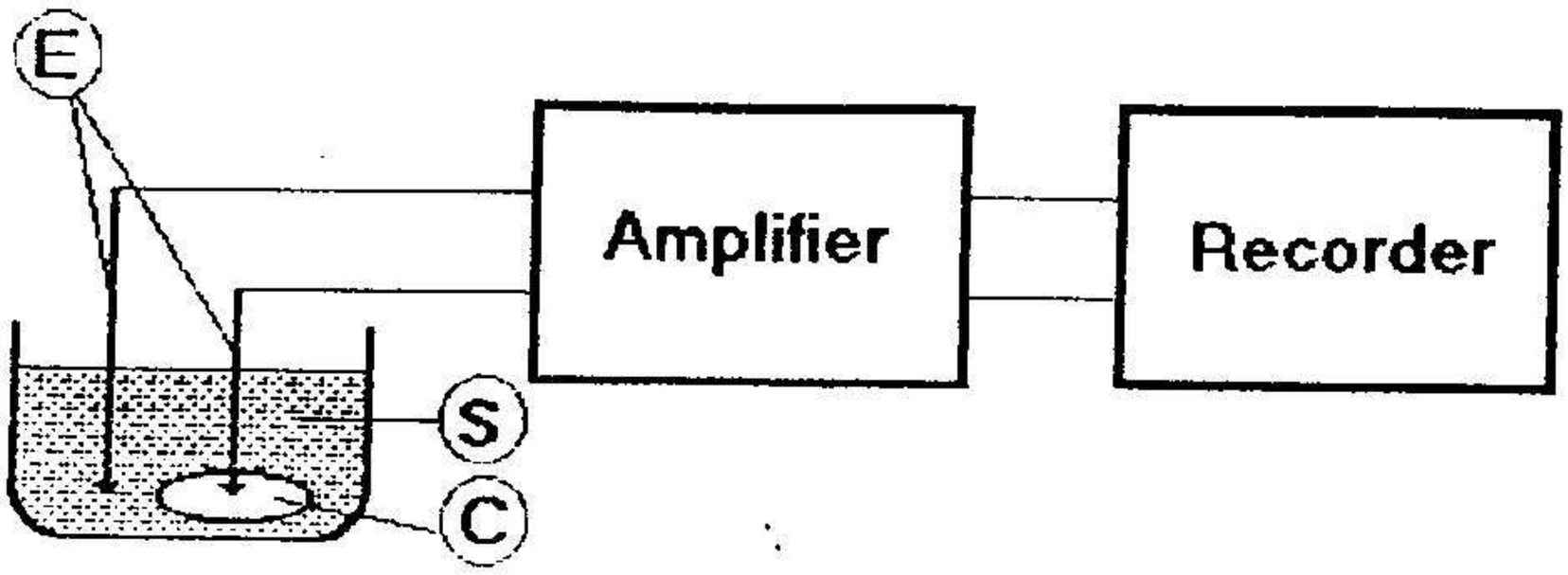
9. **กรงฟาราเดย์** (Faraday Cage)

การบันทึกสัญญาณไฟฟ้าจะไม่สามารถกระทำได้ ถ้าขาดกรงฟาราเดย์ เนื่องจากศักย์ไฟฟ้าที่วัดมีขนาดเล็ก จึงทำให้สัญญาณที่ปรากฏเป็นสัญญาณแทรกจากภายนอกเป็นส่วนใหญ่ กรงฟาราเดย์นี้ประกอบด้วยตาข่าย 4 ด้าน ขนาด 1m x 1m x 1m ครอบบนโต๊ะซึ่งวางกล้องจุลทรรศน์และไมโครอิเล็กโตรด จะเปิดเฉพาะด้านผู้ทำการทดลองเท่านั้น

วิธีทดลอง

ภายหลังตรวจสอบการทำงานของเครื่องขยายสัญญาณด้วยออสซิลโลสโคปแล้ว ต่อเครื่องขยายสัญญาณอนุกรมกับเครื่องบันทึกสัญญาณ ส่วนขั้วบวก-ลบของเครื่องขยายสัญญาณต่อเข้ากับไมโครอิเล็กโตรด และอิเล็กโตรดอ้างอิงตามลำดับ รูปที่ 2 แสดงการต่อวงจรอย่างหยาบ ๆ

วางต้นข้าวกล้าลงในถาดทดลองซึ่งหล่อเลี้ยงด้วยสารละลาย Hoagland จัดให้อัตราการไหลเข้า-ออกจากถาดมีขนาดเดียวกัน เพื่อป้องกันการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายซึ่งอาจเกิดจากการรั่วของของเหลวภายในเซลล์



รูปที่ 2 ไดอะแกรมแสดงการต่อวงจรเพื่อวัดศักย์ไฟฟ้าภายในเซลล์
C = เซลล์ , S = สารละลายเลี้ยงเซลล์ , E = อิเล็กโตรด

ก่อนแทงไมโครอิเล็กโตรดเข้าสู่เซลล์ จะทำการตรวจสอบขนาดของปลายแหลมให้มีความต้านทานตามต้องการ จะตรวจสอบความต่างศักย์ระหว่างไมโครอิเล็กโตรด และอิเล็กโตรดอ้างอิง ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง -10mV ถึง -60mV ขึ้นกับการเตรียมครั้งเซลล์แต่ละครั้ง เนื่องจากไม่สามารถมองเห็นปลายแหลมของไมโครอิเล็กโตรดผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบสเตริโอกำลังขยาย 160 เท่าได้ การแทงไมโครอิเล็กโตรดเข้าสู่เซลล์จึงบอกด้วยสัญญาณไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลันในทิศทางลบ (Anderson และ Higinbotham, 1975) กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการทดลองนี้จึงมีประโยชน์เพื่อเล็งให้เข็มและรากข้าวอยู่ในระนาบเดียวกัน และตรวจสอบว่าเข็มไม่หักหรือโค้งงอขณะที่แทงไมโครอิเล็กโตรดเข้าไปในเซลล์

การแทงไมโครอิเล็กโตรดเข้าสู่เซลล์หากพลาดเป้า ปลายเข็มจะหักซึ่งทราบได้จากการลดลงของความต้านทาน การใช้เข็มเดิมบ่อย ๆ จะทำให้ความต้านทานที่ปลายเข็มเพิ่มขึ้นได้เนื่องการอุดตันของของเหลวในเซลล์ หากการแทงปลายเข็มลงไปในเซลล์ครั้งใดพบว่า ศักย์ไฟฟ้าตีกลับไปในทิศทางบวกแสดงว่า ปลายเข็มกำลังทับผนังเซลล์แต่ละรากที่ใช้ทดลองจะถูกแทงด้วยไมโครอิเล็กโตรดประมาณ 5 ครั้ง ที่ระยะห่างกันประมาณ 5 มิลลิเมตร โดยเริ่มจากระยะ 5 มิลลิเมตร เหนือปลายราก

สรุปผลและวิจารณ์

จากการวัดศักย์ไฟฟ้าในเซลล์รากข้าวที่หล่อเลี้ยงด้วยสารละลาย Hoagland พบว่า ในจำนวน 20 เซลล์ ศักย์ไฟฟ้ามีค่าเฉลี่ย -130 ± 10 mV โดยภายในเซลล์มีสภาพลบเทียบกับภายนอก ค่าที่วัดได้นี้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้หากเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากรากถั่วเขียวซึ่งมีขนาด -154 ±32 mV (Hideo และเพื่อน,1990) หรือจากรากหญ้า (Dunlop, 1976)

เนื่องจากครึ่งเซลล์ที่ใช้กับอิเล็กโตรดอ้างอิงเป็นชนิดที่ทำขึ้นเอง รอยต่อระหว่าง Ag-AgCℓ กับลวดตัวนำไฟฟ้าบางครั้งมีข้อบกพร่องทำให้สัญญาณรั่วหรือถูกรบกวนง่าย โดยสังเกตุได้จากการแกว่งกลับไปกลับมาของสัญญาณบนเครื่องบันทึกผล และหาก Ag-AgCℓ ใช้งานนานจะเกิดการสึกกร่อน ทำให้สัญญาณแกว่งเช่นเดียวกัน

อาจมีคำถามว่าสะพานเกลือที่อิเล็กโตรดอ้างอิง ถ้าจะใช้หลอดแก้วแคปิลลารีบรรจุเฉพาะ 3M KCℓ จะเพียงพอหรือไม่ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความสมมาตรระหว่างขั้วทั้งสอง จากการทดลองพบว่าสารละลายเกลือ 3M KCℓ จะแพร่ออกนอกหลอดแก้วเนื่องจากผลต่างความเข้มข้น นอกจากจะทำให้สารละลายในถาดทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นแล้ว ยังทำให้ความต่างศักย์ระหว่างครึ่งเซลล์ทั้งสองเปลี่ยนแปลงด้วย หากนำครึ่งเซลล์สำเร็จรูปเหมือนที่ใช้กับไมโครอิเล็กโตรดมาใช้กับอิเล็กโตรดอ้างอิงด้วยอาจทำให้การวัดสัญญาณง่ายขึ้น

กล่าวโดยสรุป ระบบวัดศักย์ไฟฟ้านี้สามารถใช้งานได้ดีระดับหนึ่ง เมื่อต้องการทราบขนาดของศักย์ไฟฟ้าภายใต้สภาวะแวดล้อมหนึ่ง ๆ อย่างไรก็ดีได้ลองเปลี่ยนสภาพกรด-ด่างของสารละลายภายนอกเซลล์ทีละ 0.4 หน่วย พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าได้เด่นชัด เนื่องจากความหยาบของสเกลในเครื่องบันทึกผล ทั้ง ๆ ที่ศักย์ไฟฟ้าภายในเซลล์จะไวต่อการเปลี่ยน pH ของสารละลายมาก (Pitman, 1970) คาดว่าเครื่องบันทึกผลที่มีความละเอียดกว่าที่ใช้อยู่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการวัดได้ระดับหนึ่ง นอกจากนี้ระบบที่สร้างขึ้นมานี้ ถ้าพัฒนาต่อไปจะสามารถศึกษาความชื้มชาบได้ของเยื่อเซลล์ต่อไอออนชนิดต่าง ๆ โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสารละลายภายนอกเซลล์ ในขณะที่วัดศักย์ไฟฟ้า และสามารถใช้ศึกษาการตอบสนองต่อสัญญาณกระตุ้นในพืชได้ด้วย จึงนับว่ามีประโยชน์ในแง่การเรียนการสอนในสาขาชีวฟิสิกส์พอสมควร

เอกสารอ้างอิง

1. Anderson, W.P. and Higinbotham, N.(1975). J. Exp. Bot.26, 533-535.
2. Bingley, M.S.(1964). Nature 202, 1218.
3. Dunlop, J.(1976) J. Exp. Bot. 27; 908-915.
4. Hides, I. and Evans, M.L.(1990) Plant Cell Physiol. 31(4) : 457-462.
5. Pitman, M.G.(1970). Plant Physiol. 45, 787.