

215 การเปลี่ยนรูปของโปรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ  $\omega = 6$   
The Deformation of *Dendrobium* sp. Protoplasts in AC Electric Fields  $\omega = 6$

160 คุณกานต์ มาศวิวัฒน์  
Kanokkan Maswiwat

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์

110 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ๖ ๑๐๖ ๘๑๑๖๓๖๓๖๓๖

Master of Science Thesis in Physics

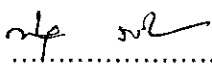
Prince of Songkla University

2543

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ  
ผู้เขียน นางสาว กนกกานต์ มาศวิวัฒน์  
สาขาวิชา ฟิสิกส์

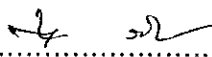
คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ



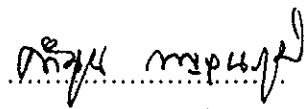
.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิกุล วณิชากิจชาติ)



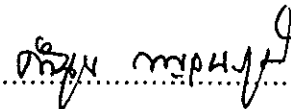
.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิกุล วณิชากิจชาติ)



.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กำนุณ กาญจนภูมิ)

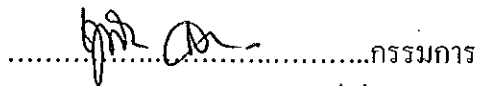


.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กำนุณ กาญจนภูมิ)

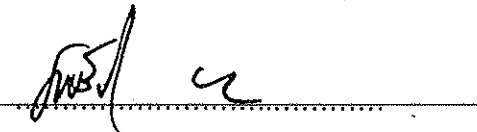
.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงรัชนี นันทวิสารกุล)



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูศักดิ์ ลิ้มสกุล)

๖๗๐  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย จดบันทึกเป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์ X *ในชื่อวิชา*



(รองศาสตราจารย์ ดร.นพรัตน์ บำรุงรักษ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงรูปของโพรโทพลาสต์ *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  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ใช้เวลาในการย่อยผนังเซลล์ 4 ชั่วโมง เมื่อทดลองกับสนามไฟฟ้าแวลนลอยโพรโทพลาสต์ในสารละลายแมนนิทอล ที่มีค่าความดันออสโมติกประมาณ  $1.24 \text{ MPa}$  เหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์ระหว่างขั้วไฟฟ้าทรงกระบอกขนาน โดยเปลี่ยนสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย 3 ค่า คือ  $1 \text{ mS.m}^{-1}$ ,  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  และ  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  พบที่สนามไฟฟ้า  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  โพรโทพลาสต์เกาะขั้วไฟฟ้าที่ความถี่ระหว่าง 3 kHz ถึง 15 MHz และขอบเขตความถี่ต่ำจะเพิ่มขึ้นเป็น 5 kHz เมื่อใช้กลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่นประมาณ  $2 \times 10^4$  per ml นอกจากนี้พบว่าความถี่ขอบเขตต่ำเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้า หรือสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย ส่วนขอบเขตความถี่สูงเท่ากับขีดจำกัดของเครื่องมือคือ 15 MHz ทุกกรณีที่ศึกษา เมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  ทั้งโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์จะยึดก่อนเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้า

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้า ได้ยึดโพรโทพลาสต์ให้เกาะขั้วไฟฟ้า โดยใช้ความถี่ 1 MHz สนามไฟฟ้าขนาด  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  แล้วเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $30 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  ถึง  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  พบว่าโพรโทพลาสต์มีความยืดหยุ่นตามกฎของฮุก (Hooke's Law) ระหว่างความถี่ 0.5 MHz ถึง 10 MHz โพรโทพลาสต์ยึดได้สูงสุดหลังจากเหนี่ยวนำนาน 2 นาที เวลาที่ยึดได้สูงสุดนี้ไม่ขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้า มีข้อสังเกตว่าที่ความถี่ต่ำ (0.5 MHz) และสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายสูง ( $20 \text{ mS.m}^{-1}$ ) การยึดของโพรโทพลาสต์เกิดขึ้น 2 จังหวะ ที่ทุกค่าสนามไฟฟ้าที่ทดลอง ส่วนการยึดของครึ่งแกนเอกและครึ่งแกนโท (a/b) เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของสนามไฟฟ้า ส่วนความถี่จะมีผลต่อการยึดอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มสนามไฟฟ้าสูงกว่า  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  นอกจากนี้เมื่อเพิ่มสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายจาก  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  เป็น  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  และให้สนามไฟฟ้าคงที่  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  พบว่าความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์ยึดได้สูงสุดจะเปลี่ยนจาก 1 MHz ( $a/b=1.46 \pm 0.02$ ) เป็น 5 MHz ( $a/b=1.37 \pm 0.01$ )

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

( $14.7 \pm 0.6$  s) ไม่ขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้า โดยการเพิ่มเวลาจาก 3 นาที ถึง 20 นาที ไม่มีผลต่อการคืนรูป และหากให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าเป็นเวลา 1 นาที เวลาในการคืนรูปจะสั้นกว่า ( $10.0 \pm 0.1$  s) อย่างไรก็ตามหากใช้สนามไฟฟ้า  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  นานเกิน 5 นาที โพรโทพลาสต์จะไม่คืนรูป หรือเกิดการรบกวนบริเวณผิวด้านตรงกันข้ามกับผิวที่สัมผัสขั้วไฟฟ้า นอกจากนี้หากใช้ความถี่ต่ำกว่าความถี่ขอบต่ำของสเปกตรัมไดอิเล็กทริกโพรโทพลาสต์จะแตกเสมอ เมื่ออาศัยทฤษฎีแรงดึงทางไฟฟ้าของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว พบว่าค่าคงที่ของการยืดหยุ่น (K) และค่านัยมอดูลัส (Y) โดยประมาณคือ  $0.037 \pm 0.011 \text{ mN.m}^{-1}$  และ  $1.38 \pm 0.15 \text{ N.m}^{-2}$  ตามลำดับ

เมื่อศึกษาผลของสนามไฟฟ้าต่อการดูดซึมฟอสเฟต โดยใช้ไอโซโทปรัังสี  $\text{NH}_4\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$  โพรโทพลาสต์ที่ถูกเหนี่ยวนำในสนามไฟฟ้าขนาด  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  นาน 3 นาที พบว่าการดูดซึมฟอสเฟตไม่ต่างจากชุดควบคุม แต่ลดลงเมื่อความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  เมื่อตรวจสอบการมีชีวิตของกลุ่มโพรโทพลาสต์ด้วยสารเรืองแสง FDA พบว่าเมื่อให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าขนาด  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  นาน 3 นาที เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเป็น 89% และ 70% ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ลดลงเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้านานขึ้น แสดงให้เห็นว่าความเข้มสนามไฟฟ้าสูงและเวลาที่ให้เซลล์อยู่ในสนามไฟฟ้านานเกินไปจะทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทพลาสต์เกิดขึ้นได้สูง จึงสรุปว่าการดูดซึมฟอสเฟตที่ลดลงในสนามไฟฟ้าและเวลาของการเหนี่ยวนำสูงเกิดจากโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตลดจำนวนลง

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

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

### Abstract

*Dendrobium* sp. protoplasts were prepared by dissolving 2% Cellulase, 1% Driselase and 0.5% Marcerozyme in  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  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  $1 \text{ mS.m}^{-1}$ ,  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  and  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  conductivity, before being induced in between a pair of cylindrical electrodes. Under  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  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  $2 \times 10^4$  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  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  and  $60 \text{ kV.m}^{-1}$ , 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  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  field strength. The field was then increased to  $30 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  and  $85 \text{ kV.m}^{-1}$ . 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 ( $20 \text{ mS.m}^{-1}$ ), 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  $45 \text{ kV.m}^{-1}$ . When solution conductivity was increased from  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  to  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  under constant  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  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  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  and  $85 \text{ kV.m}^{-1}$ , protoplasts exposed to the field between 3 minutes and 20 minutes showed constant restoring time ( $14.7 \pm 0.6 \text{ s}$ ), independently from field strength. The restoring time was shorter ( $10 \pm 0.1 \text{ s}$ ) when field exposure time was 1 minute. When protoplasts were exposed to  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  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  $0.037 \pm 0.011 \text{ mN.m}^{-1}$  and  $1.38 \pm 0.15 \text{ N.m}^{-2}$ , respectively.

Effect of AC electric fields on phosphate uptake was studied by using radioisotope of  $\text{NH}_4\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$ . Protoplasts exposed to  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  field strength for 3 minutes showed no difference in the uptake compared to the control, whereas those exposed to  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  and  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  reduced in the uptake. In separate experiment with FDA, viability of protoplasts was tested using  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  and  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  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.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยความรู้ของคณาจารย์ และความอนุเคราะห์จากหน่วยงานผู้สนับสนุนทุนการศึกษาและวิจัย ดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. พิภูต วนิชากิชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร. คำนุณ กาญจนภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความรู้และคำชี้แนะเกี่ยวกับการทำวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ดวงรักษ์ นันทวิสารกุล และ ผศ.ดร. ชูศักดิ์ ลิ้มสกุล ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และสำนักงานสถาบันราชภัฏ กระทรวงศึกษาธิการ สำหรับทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัย

ขอกราบแทบเท้าคุณแม่ และขอบคุณสมาชิกครอบครัว “มาศวิวัฒน์” ทุกคนที่ให้โอกาสและเป็นกำลังใจตลอดการศึกษา

ขอบคุณเพื่อนๆ ภาควิชาฟิสิกส์ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกคน สำหรับความช่วยเหลือ และกำลังใจ สุดท้ายทำให้ข้าพเจ้าได้ข้อคิดว่า “ปัญหาทุกอย่าง ย่อมมีทางแก้ไข ถ้าใจสู้”

กนกกานต์ มาศวิวัฒน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	2
1.2 การตรวจเอกสาร	6
1.3 วัตถุประสงค์	17
2 ทฤษฎี	18
3 วิธีการวิจัย	30
3.1 วัสดุ	30
3.2 อุปกรณ์	31
3.3 วิธีดำเนินการ	36
4 ผลและการอภิปรายผล	53
5 วิจารณ์ผล	88
6 สรุปและข้อเสนอแนะ	96
บรรณานุกรม	100
ภาคผนวก	109
ประวัติผู้เขียน	139

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1 จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากเอนไซม์ผสมทั้ง 4 สูตร โดยใช้เวลาในการย่อย 3 ชั่วโมง	53
2 จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกด้วยเอนไซม์สูตรที่ 3	54
3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโพรโทพลาสต์ที่ยังเป็นทรงกลมเมื่อแขวนลอย ในสารละลายแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน	55
4 เปรียบเทียบสเปกตรัม DEP ของโพรโทพลาสต์	56
5 เปรียบเทียบสเปกตรัม DEP ของกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น ( $1.91 \pm 0.31$ ) $\times 10^4$ per ml	58
6 เปรียบเทียบเวลาที่โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้ากับเวลาในการคืนรูป เมื่อ $\sigma_s$ 10 mS.m <sup>-1</sup>	74
7 ความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตกที่ความเข้มสนามไฟฟ้าต่างกัน เมื่อ $\sigma_s$ 10 mS.m <sup>-1</sup>	76
8 ค่า $Re[\tilde{\mu}(\omega)]$ เมื่อเปลี่ยนความถี่และสภาพนำไฟฟ้า 2 ค่า	77
9 พลั๊กซ์ของโพรโทพลาสต์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้านาน 5 นาที	85
10 เปรียบเทียบสเปกตรัมไดอิเล็กโตรฟอเรติกระหว่างโพรโทพลาสต์และ กลุ่มโพรโทพลาสต์ความหนาแน่น ( $1.91 \pm 0.31$ ) $\times 10^4$ per ml	89
11 เปรียบเทียบค่า K และ Y ของโพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp. กับเซลล์ แต่ละชนิดจากงานวิจัยอื่น	93
12 ความหนาแน่นของสารละลายแมนนิทอล	113
13 ค่าความหนืดของสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	113
14 ความหนาแน่นของสารละลายซูโครส	114
15 ความหนืดของสารละลายซูโครสความเข้มข้นต่างๆ กัน	114
16 การปรับสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายแมนนิทอล 0.5 kmol.m <sup>-3</sup>	115

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
17 จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ด้วยสารละลายเอนไซม์ผสม 4 สูตร ใช้เวลาในการย่อย 3 ชั่วโมง	119
18 จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกด้วยสารละลายเอนไซม์ผสมสูตรที่ 3	119
19 ขนาดโพรโทพลาสต์เฉลี่ย	120
20 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 0.5 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์ $48.30 \pm 1.37 \mu\text{m}$ $\sigma_s$ 1 $\text{mS.m}^{-1}$	123
21 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 1 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์ $47.59 \pm 1.56 \mu\text{m}$ $\sigma_s$ 1 $\text{mS.m}^{-1}$	124
22 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 5 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์ $46.69 \pm 1.24 \mu\text{m}$ $\sigma_s$ 1 $\text{mS.m}^{-1}$	124
23 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 10 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์ $48.00 \pm 1.35 \mu\text{m}$ $\sigma_s$ 1 $\text{mS.m}^{-1}$	125
24 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่เวลาในการให้สนามไฟฟ้า 3 นาที $\sigma_s$ 1 $\text{mS.m}^{-1}$	125
25 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 0.5 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์ $47.29 \pm 1.39 \mu\text{m}$ $\sigma_s$ 20 $\text{mS.m}^{-1}$	126
26 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 1 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์ $46.94 \pm 1.12 \mu\text{m}$ $\sigma_s$ 20 $\text{mS.m}^{-1}$	126
27 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 5 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์ $47.18 \pm 1.12 \mu\text{m}$ $\sigma_s$ 20 $\text{mS.m}^{-1}$	127
28 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 10 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์ $45.52 \pm 1.20 \mu\text{m}$ $\sigma_s$ 20 $\text{mS.m}^{-1}$	127
29 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่เวลาในการให้สนามไฟฟ้า 3 นาที $\sigma_s$ 20 $\text{mS.m}^{-1}$	128
30 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ต่างๆ กัน เมื่อให้สนามไฟฟ้า เป็นเวลา 1.5 นาที	128

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
31 เปรียบเทียบระยะยืดของโพรโทพลาสต์ที่เวลาในสนามไฟฟ้า 5 นาที	129
32 ระยะยืด a และ b เมื่อ $\sigma_s$ 1 mS.m <sup>-1</sup> ที่เวลาในสนามไฟฟ้า 3 นาที	131
33 ระยะยืด a และ b เมื่อ $\sigma_s$ 20 mS.m <sup>-1</sup> ที่เวลาในสนามไฟฟ้า 3 นาที	132
34 ค่า K จากข้อมูล a/b ของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามไฟฟ้า 3 นาที	133
35 ความเค้นของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามนาน 3 นาที $\sigma_s$ 1 mS.m <sup>-1</sup>	134
36 ความเค้นของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามนาน 3 นาที $\sigma_s$ 20 mS.m <sup>-1</sup>	135
37 ความเครียดของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามนาน 3 นาที $\sigma_s$ 1 mS.m <sup>-1</sup>	135
38 ความเครียดของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามนาน 3 นาที $\sigma_s$ 20 mS.m <sup>-1</sup>	135
39 อัตราการดูดซึมฟอสเฟต ( <sup>32</sup> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) ของโพรโทพลาสต์	138
40 เปรียบเทียบฟลักซ์ของโพรโทพลาสต์ที่เวลาในสนามไฟฟ้าต่างกัน	138
41 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า	138

## รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่ไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้าของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในช่วงความถี่ $\alpha, \beta, \gamma$	3
2 เส้นแรงสนามไฟฟ้ารอบๆ เซลล์ชีวภาพใน 3 ช่วงความถี่	4
3 โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นไขมัน 2 ชั้น ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ของโปรตีนแทรกอยู่และคาร์โบไฮเดรตอยู่เฉพาะบริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์	7
4 แบบจำลองเยื่อหุ้มเซลล์ที่กั้นระหว่างตัวนำภายในและภายนอกเซลล์	8
5 การยืดของเซลล์เนื่องจากแรงดึงทางไฟฟ้า	22
6 การแลกเปลี่ยนไอออนที่เสถียร ( $\circ$ ) และไม่เสถียร ( $\bullet$ ) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์	25
7 การเพิ่มของปริมาณรังสีในเซลล์ภายในเวลา T	26
8 แบบจำลองการแลกเปลี่ยนสารของเซลล์ทรงกลม	28
9 ชุดอุปกรณ์เหนี่ยวนำโพโรโทพลาสติก	34
10 ชุดอุปกรณ์นับรังสี	35
11 ขั้นตอนการแยกโพโรโทพลาสติก <i>Dendrobium</i> sp. ออกจากแผ่นใบ	41
12 การแยกชั้นของโพโรโทพลาสติกจากการทำ Sucrose density gradient	42
13 โพโรโทพลาสติกที่ผ่านการย่อยเอาผนังเซลล์ออกแล้ว	43
14 แผนภาพอุปกรณ์ทดลองสำหรับศึกษาการยืดของโพโรโทพลาสติก <i>Dendrobium</i> sp.	46
15 ความเข้มสนามไฟฟ้าที่ตำแหน่งต่างๆ ระหว่างขั้วไฟฟ้าในแนวแกน z เมื่อศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วมีค่าต่างๆ	47
16 การเหนี่ยวนำโพโรโทพลาสติก <i>Dendrobium</i> sp. ให้เกาะขั้วไฟฟ้า (a) และศึกษาการยืดของโพโรโทพลาสติกในสนามไฟฟ้าขนาดต่างๆ กัน (b)	49

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
17 การเกิดโซ่ของกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 1.56x10 <sup>4</sup> per ml เมื่อ $\sigma_s$ 10 mS.m <sup>-1</sup> ความถี่คงที่ 1 MHz (a) 0 kV.m <sup>-1</sup> (b) 17 kV.m <sup>-1</sup> (c) 45 kV.m <sup>-1</sup> (d) 60 kV.m <sup>-1</sup>	60
18 การยืดของโพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp. วัดความยาว a และ b ที่เวลาในสนามไฟฟ้า 1.5 นาที $\sigma_s$ 20 mS.m <sup>-1</sup> ความถี่ 1 MHz	62
19 ผลของสนามไฟฟ้าต่อการยืดของโพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp. เมื่อเปลี่ยนแปลงความถี่ของสัญญาณ แต่ละข้อมูลบันทึกที่เวลา 5 นาที ของการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า (a) $\sigma_s$ 1 mS.m <sup>-1</sup> (b) $\sigma_s$ 20 mS.m <sup>-1</sup>	63
20 ลำดับการยืดของโพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp. เทียบกับเวลา ในสนามไฟฟ้า 85 kV.m <sup>-1</sup> และ ความถี่ 1 MHz เมื่อ $\sigma_s$ 1 mS.m <sup>-1</sup>	65
21 การยืดของโพรโทพลาสต์ช่วง 5 นาที ขณะที่ถูกเหนี่ยวนำใน สนามไฟฟ้าขนาดต่างๆ กัน เมื่อ $\sigma_s$ 1 mS.m <sup>-1</sup> (a) ความถี่ 0.5 MHz (b) ความถี่ 1 MHz (c) ความถี่ 5 MHz (d) ความถี่ 10 MHz	67
22 การยืดของโพรโทพลาสต์ช่วง 5 นาที ขณะที่ถูกเหนี่ยวนำใน สนามไฟฟ้าขนาดต่างๆ กัน เมื่อ $\sigma_s$ 20 mS.m <sup>-1</sup> (a) ความถี่ 0.5 MHz (b) ความถี่ 1 MHz (c) ความถี่ 5 MHz (d) ความถี่ 10 MHz	69
23 แสดงการแตกของโพรโทพลาสต์ (a) สนามไฟฟ้า 17 kV.m <sup>-1</sup> และความถี่ 1 MHz (b) ความเข้มสนาม 85 kV.m <sup>-1</sup> ความถี่ 0.5 MHz และ $\sigma_s$ 20 mS.m <sup>-1</sup> หลังจากให้สนามไฟฟ้านาน 30 วินาที โพรโทพลาสต์แตก	70
24 ผลการยืดของโพรโทพลาสต์เทียบกับความถี่ที่ $\sigma_s$ ต่างกัน และอยู่ในสนามไฟฟ้าคงที่นาน 1.5 นาที (a) 85 kV.m <sup>-1</sup> , (b) 60 kV.m <sup>-1</sup> (c) 45 kV.m <sup>-1</sup> และ (d) 30 kV.m <sup>-1</sup>	72

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
25 เปรียบเทียบโพรโทพลาสต์เมื่อให้สนามไฟฟ้า $17 \text{ kV.m}^{-1}$ (a) และเมื่อให้ความเข้มสนามไฟฟ้า $85 \text{ kV.m}^{-1}$ ความถี่ 1 MHz ในสารละลาย $\sigma_s 1 \text{ mS.m}^{-1}$ นาน 12 นาที (b) ตำแหน่งถูกรแสดงบริเวณที่สารถูกปลดปล่อยออกจากโพรโทพลาสต์	73
26 การเสียดภาพของโพรโทพลาสต์โดยไม่สามารถคืนรูปสู่สภาพเดิมได้ (a) สนามไฟฟ้า $17 \text{ kV.m}^{-1}$ สารละลายมี $\sigma_s 10 \text{ mS.m}^{-1}$ (b) หลังจากให้สนามไฟฟ้า $85 \text{ kV.m}^{-1}$ ความถี่ 1 MHz เป็นเวลา 10 นาทีหรือให้คืนรูปนาน 5 นาที ปรากฏว่าโพรโทพลาสต์ไม่สามารถคืนสู่รูปเดิมได้	75
27 ความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (stress) กับความเครียด(strain) A,B,C และ D แทนกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีขนาดเดียวกันแต่ได้จากการย่อยโพรโทพลาสต์ต่างชุดกัน เมื่อ $\sigma_s 1 \text{ mS.m}^{-1}$ (a) 0.5 MHz (b) 1 MHz (c) 5 MHz และ (d) 10 MHz	80
28 ความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (stress) กับความเครียด(strain) A,B,C และ D แทนกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีขนาดเดียวกันแต่ได้จากการย่อยโพรโทพลาสต์ต่างชุดกัน เมื่อ $\sigma_s 20 \text{ mS.m}^{-1}$ (a) 1 MHz (b) 5 MHz (c) 10 MHz	82
29 ความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นกับความถี่เมื่อให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้า นาน 3 นาที	83
30 เปรียบเทียบอัตราการดูดซึม $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ (cpm) ของโพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp. ที่ผ่านการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที กับชุดควบคุม หลังจากการให้โพรโทพลาสต์ดูดซึมสารรังสีนาน 3 ชั่วโมง เมื่อ Blank คืออัตรานับรังสีบนกระดาษกรองของสารละลายที่ไม่มีโพรโทพลาสต์แฉวนลอย (Blackground เป็น 27.11 cpm)	86
31 ผลของเวลาในสนามไฟฟ้าต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp. ที่อยู่ในสนามไฟฟ้าต่างๆ กัน	87

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
32 แบบจำลองการเปลี่ยนรูปของเซลล์ทรงกลมเนื่องจากแรงดึงทางไฟฟ้า	122
33 ความสัมพันธ์ระหว่างความถี่กับค่าจริงของฟังก์ชันความถี่ ของโพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp. ที่สภาพนำไฟฟ้า $1 \text{ mS.m}^{-1}$	136
34 ความสัมพันธ์ระหว่างความถี่กับค่าจริงของฟังก์ชันความถี่ ของโพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp. ที่สภาพนำไฟฟ้า $20 \text{ mS.m}^{-1}$	137

## บทที่ 1

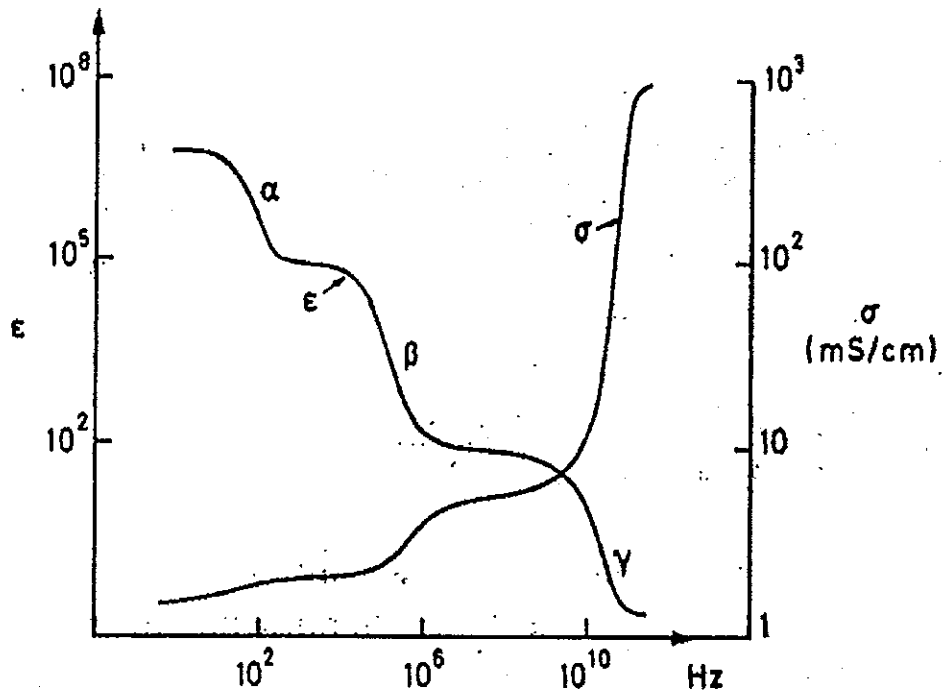
### บทนำ

การศึกษาผลของไฟฟ้าต่อเซลล์ชีวภาพเป็นที่สนใจของนักวิจัยหลายกลุ่ม ได้แก่ ด้านการแพทย์ ชีวฟิสิกส์ เทคโนโลยีชีวภาพ และพันธุวิศวกรรม ตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 20 จนถึงปัจจุบัน เพื่อพัฒนางานด้านดังกล่าวให้เกิดประโยชน์สูงสุด โพรโทพลาสต์จัดเป็นเซลล์ชีวภาพอีกชนิดหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจ เช่น การหาวิธีปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแปลกตา โดย Zimmermann และ Vienken (1982) ได้จุดประกายวิธีการรวมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า และถือได้ว่าเป็นวิธีที่ดีกว่าวิธีอื่น ๆ เช่น หลีกเลี้ยงสภาวะโพรโทพลาสต์มีรูปร่างผิดปกติไปซึ่งเกิดจากเทคนิคการใช้สารเคมี เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การที่จะนำเอาเทคนิคทางไฟฟ้ามาประยุกต์ใช้กับเซลล์ชีวภาพชนิดใดนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบสมบัติทางไฟฟ้าและสมบัติเชิงกลของเซลล์ชนิดนั้น ๆ Pohl (1978) เสนอว่าเซลล์ชีวภาพตอบสนองต่อสัญญาณความถี่ไฟฟ้ากระแสสลับทำให้เกิดพฤติกรรมที่แตกต่างกันไป เช่น การเคลื่อนที่ การหมุน การเปลี่ยนรูปและการแตกของเซลล์ เป็นต้น Zimmermann และคณะ (1977) อธิบายสาเหตุที่ทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปในสนามไฟฟ้าว่าเกิดจากความต่างศักย์บนเยื่อหุ้มเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลต่อแรงกดทางไฟฟ้า วิธีการดังกล่าวสามารถนำไปหาสมบัติเชิงกลของเซลล์ได้

เซลล์ที่เลือกศึกษาในงานวิจัยนี้ คือ โพรโทพลาสต์ของใบกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ตัดดอกที่นิยมส่งออกไปขายยังต่างประเทศตลอดระยะเวลาเกือบ 40 ปี (สุวรรณ, 2540) และเนื่องจากโพรโทพลาสต์เป็นเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์เพียงชั้นเดียว จึงสามารถศึกษาผลของความเข้มสนามไฟฟ้า เวลา และความถี่ของสัญญาณไฟฟ้า ต่อการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ได้ โดยอาศัยทฤษฎีตามแบบจำลองของทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว

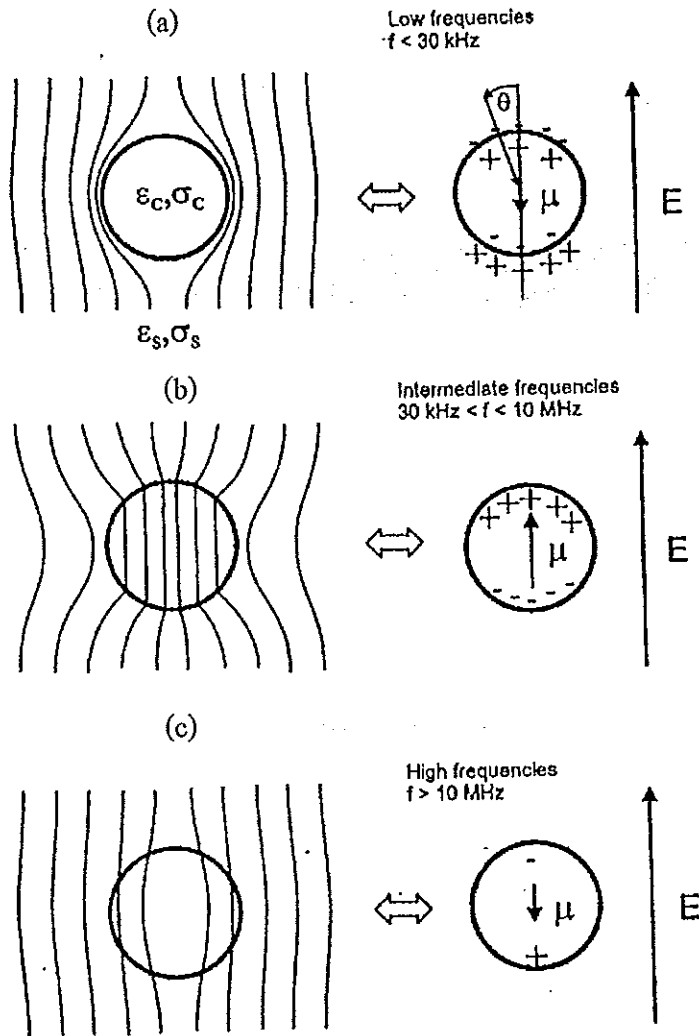
## 1.1 บทนำสั้นเรื่อง

เซลล์ชีวภาพจัดเป็นวัสดุไดอิเล็กทริก เมื่อแขวนลอยอยู่ในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้าต่ำ และถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าแบบไม่สม่ำเสมอจะเกิดโพลาริเซชันของประจุภายในเซลล์ เรียกว่า เกิดไดโพลโมเมนต์ Pohl (1978) เสนอว่าปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโพลาริเซชันขึ้นในเซลล์ชีวภาพ มี 4 ประการ ได้แก่ 1. ภายในเซลล์ชีวภาพมีโมเลกุลน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก 2. มีโมเลกุลจำนวนมากที่เป็นขั้วทางไฟฟ้า ได้แก่ โปรตีน DNA และ RNA เป็นต้น ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้สามารถเกิดโพลาริเซชันได้ 3. ผิวเซลล์ชีวภาพมีโครงสร้างคล้ายตัวเก็บประจุ เช่น ชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ที่กั้นระหว่างสารละลายอิเล็กโทรไลต์สามารถทำให้เกิดการกระจายของประจุได้ และ 4. โครงสร้างที่ผิวเซลล์เป็นไอออนสองชั้น (ionic double layers) ทำให้สามารถเกิดการโพลาริเซชันได้จำนวนมาก เมื่อไดโพลโมเมนต์มีอันตรกิริยากับสนามไฟฟ้าภายนอก ทำให้เกิดแรงสุทธิกระทำต่อเซลล์ให้เคลื่อนที่ เรียกว่า แรงไดอิเล็กโทรโฟเรติก (dielectrophoretic force : แรง DEP) ซึ่งแบ่งเป็นสองชนิด คือ ไดอิเล็กโทรโฟเรซิสชนิดบวก (positive dielectrophoresis) เป็นแรงที่ทำให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่มีความเข้มสนามไฟฟ้าสูงกว่า (ที่ขั้วไฟฟ้า) เมื่อทิศของไดโพลโมเมนต์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เสริมกับทิศของสนามไฟฟ้าภายนอก และไดอิเล็กโทรโฟเรซิสลบ (negative dielectrophoresis) เกิดขึ้นเมื่อทิศของไดโพลโมเมนต์สวนกับทิศของสนามไฟฟ้าภายนอก ทำให้เซลล์เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีความเข้มสนามไฟฟ้าต่ำกว่า (ระหว่างขั้วไฟฟ้า) แรง DEP มีขนาดและทิศทางขึ้นกับความเข้มสนามและความถี่สัญญาณไฟฟ้า Schwan (1988) ได้แบ่งช่วงความถี่ที่เซลล์ชีวภาพตอบสนองต่อสนามไฟฟ้าไว้สามช่วง คือ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -dispersion (ภาพประกอบ 1)  $\alpha$ -dispersion หรือช่วงความถี่ย่านต่ำ ( $<10^3$  Hz) เป็นช่วงที่เกิดการกระจายของไอออนในสารละลายที่อยู่รอบๆ เซลล์และทำให้เกิดชั้นของประจุไฟฟ้ารอบผิวเซลล์ความหนาของชั้นนี้เรียกว่า Debye length มีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของประจุในสารละลาย Mahaworasilpa และคณะ (1994) เสนอว่าความถี่ช่วงนี้สนามไฟฟ้าไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ประพฤติตัวเป็นฉนวน สภาพยอมทางไฟฟ้าของสารละลายภายนอกมากกว่าภายในเซลล์ ( $\epsilon_s > \epsilon_c$ ) (ภาพประกอบ 2)  $\beta$ -dispersion เป็นช่วงความถี่ย่านกลาง หรือช่วงความถี่แมกซ์เวลล์-แวกเนอร์ (Maxwell-Wagner) มีความถี่อยู่ในช่วง  $10^3 - 10^7$  Hz ความถี่ช่วงนี้ทำให้เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างของเหลวภายในกับสารละลายภายนอกเซลล์ Mahaworasilpa และคณะ (1994) เสนอว่าที่



ภาพประกอบ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่ไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้าของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในช่วงความถี่  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

ที่มา : Schwan, 1985.



ภาพประกอบ 2 เส้นแรงสนามไฟฟ้ารอบๆ เซลล์ชีวภาพใน 3 ช่วงความถี่

ที่มา : Mahaworasilpa, *et al.*, 1994.

ช่วงความถี่นี้ค่าอิมพีแดนซ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ต่ำลงและสภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึมมากกว่าสารละลายภายนอก ( $\sigma_c > \sigma_e$ ) ส่งผลให้สนามไฟฟ้าผ่านเข้าสู่เซลล์ ช่วงความถี่นี้มีอิทธิพลมากที่สุดต่อการเกิดไดโพลโมเมนต์ของเซลล์ จึงเป็นช่วงความถี่ที่นักวิจัยให้ความสนใจศึกษามากที่สุด ส่วน  $\gamma$ -dispersion เป็นช่วงความถี่ย่านสูง ระหว่างเมกะเฮิรตซ์จนถึงจิกะเฮิรตซ์ ความถี่ช่วงนี้ความจุไฟฟ้าไม่มีผล เนื่องจากสภาพนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์มีค่าน้อยกว่าสภาพนำไฟฟ้าในไซโทพลาสซึมมากๆ ( $\sigma_m \ll \sigma_e$ )

นอกจากนี้สนามไฟฟ้าทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปไปได้เมื่อความเข้มสนามไฟฟ้ามีค่าสูงและถือเป็นพฤติกรรมหนึ่งของเซลล์เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า โดย Engelhardt และคณะ (1984) และ Engelhardt และ Sackmann (1988) ได้ศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์เม็ดเลือดแดงในสนามไฟฟ้ากระแสสลับในช่วงความถี่แมกซ์เวลล์-แวกเนอร์ ( $5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$  Hz) โดยใช้ขั้วไฟฟ้าแบบสามเหลี่ยมเพื่อหาสมบัติความยืดหยุ่นและวิเคราะห์แรงทางไฟฟ้าที่มีผลต่อการยึดของเซลล์ตามแบบจำลองของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว ต่อมามีการพัฒนารูปแบบของขั้วไฟฟ้าเป็นทรงกระบอกแบบสมมาตร แต่ยังคงเลือกศึกษาช่วงความถี่แมกซ์เวลล์-แวกเนอร์ และมีนักวิจัยบางกลุ่มหันมาให้ความสนใจศึกษากับเซลล์ชนิดอื่น เช่น Poznanski และคณะ (1992) ศึกษากลศาสตร์เชิงไฟฟ้าของเซลล์รา *Neurospora crassa* โดยใช้ขั้วไฟฟ้าทรงกระบอกขนานทำจากลวดแพลททินัมเลือกศึกษาที่ความถี่ 3 MHz อาศัยแบบจำลองของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียวเช่นเดียวกัน เพื่อวิเคราะห์หาความถี่เรโซแนนซ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ Mahaworasilpa (1992) ศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนูและคน โดยใช้ขั้วไฟฟ้าทรงกระบอกขนานทำจากลวดนิเกิลอัลลอยด์ ใช้ความถี่ 0.5 MHz ถึง 2 MHz วิเคราะห์แรงทางไฟฟ้าสำหรับทรงกลมเปลือกเดี่ยว แสดงให้เห็นผลของสนามไฟฟ้า ความถี่ และเวลาที่เซลล์อยู่ในสนามไฟฟ้า ต่อการยึดของเซลล์

งานวิจัยนี้จึงกำหนดขอบเขตการศึกษาการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ โดยเลือกศึกษาช่วงความถี่แมกซ์เวลล์-แวกเนอร์และใช้ขั้วไฟฟ้าทรงกระบอกแบบสมมาตรทำจากลวดนิเกิลอัลลอยด์ โดยเซลล์ต้นแบบที่ศึกษานั้นต้องสอดคล้องกับแบบจำลองทางไฟฟ้าสำหรับเซลล์ทรงกลมเปลือกเดี่ยวตาม Mahaworasilpa (1992) เนื่องจากใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดเดียวกัน เพื่อศึกษาผลของความเข้มสนามไฟฟ้า ความถี่ และเวลาที่เซลล์อยู่ในสนามไฟฟ้าต่อการยึดซึ่งอาจเป็นข้อมูลพื้นฐานทางไฟฟ้าและอาจนำไปใช้ในการบอกความผิดปกติของโพรโทพลาสต์ได้ ตลอดจนการนำไปใช้ประโยชน์ในการทำให้เบ็ดรูน

## เยื่อหุ้มเซลล์ การรวมเซลล์ และการแตกตัวของเซลล์ต่อไป

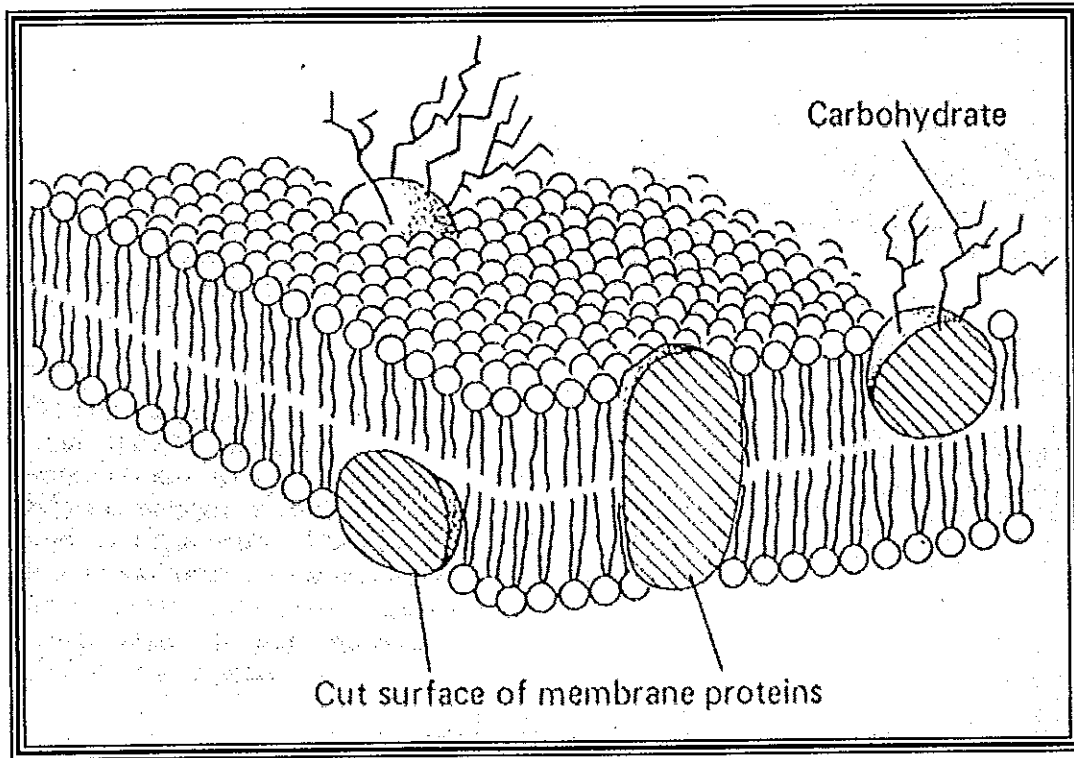
### 1.2 การตรวจเอกสาร

#### 1.2.1 ลักษณะและความสำคัญของโพรโทพลาสต์พืช

ประศาสตร์ (2538) ให้ความหมายของโพรโทพลาสต์ไว้ว่า เป็นเซลล์พืชที่ปราศจากผนังเซลล์ (cell wall) โดยการแยกผนังเซลล์ออกด้วยเอนไซม์ ดังนั้นโพรโทพลาสต์มีเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบองค์ประกอบภายในทั้งหลายเอาไว้ไม่ให้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก เมื่อนำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะสามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่และแบ่งเซลล์เพื่อเกิดเป็นต้นใหม่ได้ การสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโทพลาสต์จะมีความผันแปร บางชนิดมีชีวิตอยู่ได้ไม่กี่ชั่วโมงหลังจากแยก บางชนิดอยู่ได้เป็นหลายสัปดาห์ โดยพวกที่มีชีวิตรอดอยู่ได้จะมีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่จากนั้นตามด้วยการขยายขนาดพร้อมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ และเกิดการแบ่งตัวขึ้น การแบ่งเซลล์ครั้งแรกทำให้ได้เซลล์ลูกสองเซลล์ ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันแต่อาจเป็นสองส่วนที่ไม่เท่ากันก็ได้ หลังจากการแบ่งเซลล์อีกหลายๆ ครั้ง ก็จะกลายเป็นเซลล์โคโลนีขึ้นซึ่งสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ต่อไป และการที่โพรโทพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์เหมือนเซลล์สัตว์นั้น ย่อมมีความสามารถในการยอมให้สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่โพรโทพลาสต์ได้มากกว่าขณะที่มีผนังเซลล์ การนำเอาสิ่งต่างๆ เข้าไปในโพรโทพลาสต์ เรียกว่าการอับเทค (uptake) อาจจะเป็นไวรัสหรือออร์แกเนลล์ต่างๆ หรือการทำให้เกิดลูกผสมโดยการรวมเซลล์ สะควกขึ้น

#### 1.2.2 องค์ประกอบและโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์

เซลล์ทุกชนิดจะมีเยื่อบางๆ หนาประมาณ 7-15 nm หุ้มอยู่โดยรอบ เรียกว่า เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane, plasma membrane) ซึ่งเป็นตัวกำหนดขอบเขตของเซลล์ มีองค์ประกอบหลัก คือ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต สัดส่วนขององค์ประกอบทั้งสามของเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เยื่อหุ้มเซลล์ส่วนใหญ่จะมีโปรตีนมากกว่าไขมัน ยกเว้นแผ่นไมเอลิน (myelin sheath) ที่หุ้มใยประสาท ซึ่งมีโปรตีนเพียง 18 % เท่านั้น ไขมันจะเรียงตัวกันเป็นสองชั้นหันปลายด้านที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่มีประจุเข้าหากัน ส่วนด้านหัวที่มีประจุอยู่คนละด้าน คือชั้นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayer) มีโปรตีนชนิดกลม (globular protein) ผิงตัวอยู่ในชั้นของไขมัน และด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์จะมีสายคาร์โบไฮเดรตเกาะติดกับโปรตีนและไขมันเป็นหย่อมๆ (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นไขมัน 2 ชั้น  
มีโมเลกุลขนาดใหญ่ของโปรตีนแทรกอยู่ และคาร์โบไฮเดรตอยู่  
เฉพาะบริเวณ ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์

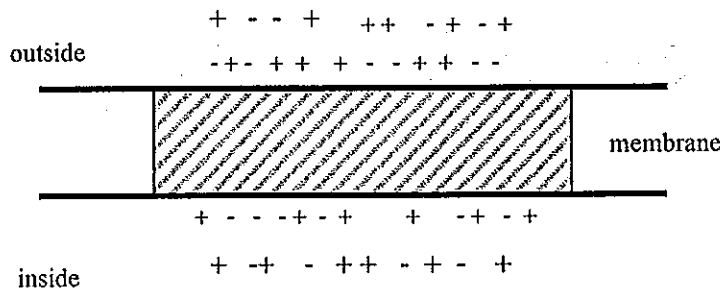
ที่มา : Robert, 1978 : หน้า 245.

### 1.2.3 สมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์ชีวภาพ

DeFelice (1997) กล่าวถึงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์ เมื่อให้เซลล์แขวนลอยในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และภายในเซลล์มีช่องที่นำไฟฟ้าได้เช่นกัน โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์กั้นระหว่างของเหลวที่เป็นตัวนำสองด้านและไม่ยอมให้อิออนเคลื่อนผ่าน จึงจัดเยื่อหุ้มเซลล์เป็นฉนวนมีหน้าที่คล้ายตัวเก็บประจุของเซลล์ ซึ่งจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดประจุมากหรือน้อยขึ้นกับความหนา และพื้นที่หน้าตัดของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังความสัมพันธ์

$$C = \epsilon_m A / \delta$$

เมื่อ  $\epsilon_m$  เป็นสภาพยอมทางไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์  
 $A$  เป็นพื้นที่หน้าตัดของเยื่อหุ้มเซลล์  
 $\delta$  เป็นความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์



ภาพประกอบ 4 แบบจำลองเยื่อหุ้มเซลล์ที่กั้นระหว่างตัวนำภายในและภายนอกเซลล์

ที่มา : DeFelice, 1997 : หน้า 50.

Zimmermann (1982) อธิบายว่าการที่เยื่อหุ้มเซลล์เปรียบเสมือนตัวเก็บประจุนั้น ทำให้สามารถเขียนวงจรไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยการต่อขนานกันของความจุไฟฟ้าและความนำไฟฟ้า และความจุไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ ( $C_m$ ) ของเซลล์ชีวภาพมีค่าประมาณ  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ค่าความจุไฟฟ้าทั้งหมดเกิดจากชั้นไฮโดรคาร์บอนของเยื่อหุ้มเซลล์สองชั้นที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของประจุเช่นเดียวกับวัสดุไดอิเล็กทริก ประจุบนเยื่อหุ้มเซลล์จะแยกตัวหรือเกิดการโพลารไรซ์ในทิศของสนามไฟฟ้า การโพลารไรซ์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นเนื่องจากไดโพลหรือการปรับตัวให้เป็นไดโพลถาวรที่เยื่อหุ้มเซลล์หรือบริเวณที่เยื่อหุ้มเซลล์สัมผัสกับสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยปกติไดโพลอาจมีทิศทางไม่แน่นอน การจัดตัวในทิศของสนามไฟฟ้าขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้าและอุณหภูมิ กล่าวคือ ที่ความเข้มสนามไฟฟ้าค่าสูงไดอิเล็กทริกจะอิมิตัวเกิดการจัดเรียงตัวของโมเลกุลทั้งหมดอย่างถาวร และไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อสนามไฟฟ้าเปลี่ยน ดังนั้นในสนามไฟฟ้ากระแสลับที่มีความถี่สูงไดโพลจะจัดเรียงตัวทันที โดยไดอิเล็กทริกจะดูดกลืนพลังงานจากสนามไฟฟ้าและการตอบสนองต่อความถี่ขึ้นกับค่าคงที่ไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้าของเซลล์ชีวภาพ

#### 1.2.4 การศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์ชีวภาพ

การศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์ชีวภาพมีจุดประสงค์หลักเพื่อศึกษาสมบัติเชิงกลของเยื่อหุ้มเซลล์ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ เทคนิคไมโครปิเปตและการใช้สนามไฟฟ้า ซึ่งรวบรวมงานวิจัยได้ดังนี้

##### ก. เทคนิคไมโครปิเปต

เป็นเทคนิคที่ให้แรงเค้นแก่เซลล์โดยดันให้เซลล์เคลื่อนผ่านหลอดไมโครปิเปต งานวิจัยที่ศึกษาด้วยเทคนิคนี้ได้แก่

Deeley และคณะ (1979) ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนแก่เซลล์ต่อการเปลี่ยนรูปของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน โดยให้แรงเค้นแก่เซลล์ด้วยวิธีดันเซลล์ให้เคลื่อนผ่านหลอดไมโครปิเปต พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถยืดได้เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน และเสนอแนะว่าเมื่ออุณหภูมิสูงอาจทำให้โครงสร้างของสเปคตรินซึ่งช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ATPase ของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไป เมื่อให้ความร้อนนาน 3 นาที และให้อุณหภูมิสูงถึง  $53^{\circ}\text{C}$  จะทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง แต่เซลล์ยืดได้เพิ่มขึ้น

Nash และ Meiselman (1983) ศึกษาการยืดหยุ่นของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เป็นผลจากความเข้มข้นของซีโมโกลบินและอายุของเซลล์ โดยให้แรงเค้นดันเซลล์เคลื่อนผ่านไมโครปิเปต เปรียบเทียบค่ามอดูลัสเฉือนของเยื่อหุ้มเซลล์และเวลาที่เซลล์คืนรูประหว่างเซลล์อ่อนกับเซลล์แก่ พบว่าเซลล์อ่อนและเซลล์แก่มีค่ามอดูลัสเฉือนเท่ากันแต่เวลาในการคืนรูปของเซลล์แก่มากกว่าเซลล์อ่อน

Pfafferott และคณะ (1985) ศึกษาผลกระทบของความหนืดภายในและภายนอกของเซลล์เม็ดเลือดแดงและอายุของเซลล์ต่อการเปลี่ยนรูป พบว่าเมื่อเพิ่มแรงดันให้เซลล์เคลื่อนในแนวเฉือน (shear flow) ผ่านไมโครปิเปต การเปลี่ยนรูปโดยการยืดของเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเซลล์อ่อนยืดได้มากกว่าเซลล์แก่ และเมื่อความหนืดของสารละลายภายนอกเพิ่มขึ้นในขณะที่แรงเค้นเฉือนคงที่ พบว่าทั้งเซลล์อ่อนและเซลล์แก่มีการยืดเพิ่มขึ้น

Waugh (1987) ศึกษาสมบัติการยืดหยุ่นของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติ กล่าวคือ มีสเปคตรินที่เยื่อหุ้มเซลล์บกพร่อง โดยให้เซลล์เคลื่อนผ่านไมโครปิเปตที่สามารถควบคุมแรงดันได้ พบว่ามอดูลัสเฉือนของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นตามความหนาแน่นของสเปคตรินที่เยื่อหุ้มเซลล์ แสดงให้เห็นว่าสเปคตรินเป็นตัวบอกความสามารถในการยืดหยุ่น ดังนั้น

เซลล์ที่คิดเชื่อค่าความหนืดของเยื่อหุ้มเซลล์และมอดูลัสเนื้อจะลดลง

Hallett และคณะ (1993) ศึกษาสมบัติเชิงกลของเวสทิเคิลสังเคราะห์ทรงกลม โดยพัฒนาแบบจำลองเพื่อแสดงผลของแรงดันออสโมติกต่อการบวมและการแตก อาศัยเทคนิคการข้อมสึด้วยสารเรืองแสงเพื่อทดสอบการรั่วของเวสทิเคิลในขณะเกิดการบวม สามารถอธิบายผลตามแบบจำลองได้ 3 ชั้น กล่าวคือ ชั้นที่ 1 แสดงให้เห็นความแตกต่างของแรงดึงที่กระทำต่อเยื่อหุ้มเซลล์ แรงดึงเพิ่มขึ้นทำให้ความเครียดของเวสทิเคิลที่มีขนาดใหญ่ เพิ่มขึ้นก่อนเวสทิเคิลที่มีขนาดเล็ก ชั้นที่ 2 บริเวณที่เวสทิเคิลแตก(รั่ว) ขนาดของรูรั่วจะค่อยๆ ลดลง และชั้นที่ 3 สารละลายที่อยู่ภายในและสารละลายภายนอกสมดุลกันเมื่อแรงดึงบนเยื่อหุ้มเซลล์คงที่ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลตามแบบจำลองทางทฤษฎีได้ขนาดของแรงกดต่อพื้นที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ และค่าข้มอดูลัสเป็น  $0.34 \text{ N.m}^{-1}$  และ  $8.2 \times 10^7 \text{ N.m}^{-2}$  ซึ่งเป็นการบอสมบัติเชิงกลและความสามารถในการยอมให้สารผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์สังเคราะห์ ที่มืองค์ประกอบของสารต่างๆ กัน เช่น ไขมัน คลอเลสเตอรอล หรือ โปรตีน เป็นต้น

Johnson (1994) ศึกษาแรงเค้นบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและการยอมให้ไอออนบวกผ่าน โดยให้เซลล์ไหลผ่านท่อทรงกระบอกที่มีสารละลายหนืด วัดฟลักซ์ของไอออนและการเปลี่ยนรูปของเซลล์ด้วยเครื่อง ektacytometer พบว่าแรงดึงบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีค่าสูง เป็นผลจากการยอมให้ไอออนบวกผ่านเพิ่มขึ้น

#### ข. เทคนิคทางไฟฟ้า

การศึกษาเปลี่ยนรูปของเซลล์ด้วยวิธีทางไฟฟ้าได้พัฒนาจากเทคนิคไมโคร-ปิเปต ซึ่งพบว่าสามารถจำกัดแรงที่กระทำต่อเซลล์และหาค่าคงที่ของความยืดหยุ่นเชิงกลได้ง่ายขึ้น Zimmermann และ Neil (1996) เสนอว่ากระบวนการที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกดึงและแตก สามารถศึกษาได้โดยให้พลังงานภายนอกมากกว่าพลังงานขีดเริ่มของเซลล์หรือเพิ่มแรงดึงผิว เพื่อสนับสนุนผลจากความดันออสโมติก หรือความเค้นเชิงกล และการให้สนามไฟฟ้าภายนอกแก่เซลล์จะไปกระตุ้นพลังงานขีดเริ่มทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดของแรงดึงผิว และการคายประจุของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้นขณะที่กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าภายนอกเท่านั้น ดังนั้นมีนักวิจัยหลายกลุ่มหันมาศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์ชีวภาพด้วยวิธีทางไฟฟ้าได้แก่

Helfrich (1974, อ้างจาก Zimmermann, 1982) แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้สนามไฟฟ้าที่มีค่าสูงแก่สามารถทำให้ถุงไขมัน (lipid vesicle) ที่มีรัศมี  $3 \mu\text{m}$  เปลี่ยนรูปโดยการ

ยึดได้ การยึดอาจทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นผลให้ความสามารถในการแลกเปลี่ยนสารเพิ่มขึ้น พบว่าในการผสมถุงไขมันกับโปรตีน (lipid protein vesicles) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติไป ซึ่งจะช่วยให้ง่ายต่อการรวมเซลล์ด้วยไฟฟ้า

Friend และคณะ (1975, อ้างจาก Zimmermann, 1982) ศึกษาการสูญเสียซูโดโทเดียม และการเปลี่ยนรูปของเซลล์อะมีบา พบว่าการยึดขึ้นกับความถี่และความเข้มสนามไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำให้เซลล์แตกของเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50 mm มีค่าประมาณ 0.5-1 V

Zimmermann และคณะ (1977) ศึกษาผลกระทบของแรงดันเนื่องจากไฟฟ้าต่อการแตกของเซลล์ *Valonia utricularis* โดยให้กระแสไฟฟ้าแบบพัลส์ วัดศักย์ไฟฟ้าที่ทำให้เซลล์แตกและให้แรงดันจากไมโครปิเปต พบว่าศักย์ไฟฟ้าบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำให้เซลล์แตกจะลดลงเมื่อแรงดันต่ำลงเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ผลเชิงทฤษฎีประมาณค่ามอดูลัสเชิงอัดของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ว่ามีค่าอยู่ในช่วง  $59 \times 10^5 \text{ N.m}^{-2}$  -  $96 \times 10^5 \text{ N.m}^{-2}$

Scheurich และคณะ (1980, อ้างจาก Zimmermann, 1982) ศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์เม็ดเลือดแดงพบว่าเมื่อให้เซลล์แขวนลอยในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เหนียวน้ำ เซลล์ด้วยสนามไฟฟ้ากระแสสลับ พบว่าเซลล์จะวางตัวตั้งตรงตามแนวสนามไฟฟ้า และเกิดโซ่เซลล์ เซลล์สามารถยึดตัวได้เมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้า และเมื่อค่าสนามไฟฟ้ามากเกินไปจะทำให้เซลล์มีลักษณะเป็นหลอด (erythrocyte tubes) ซึ่งเป็นรูปแบบที่เห็นการยึดได้ชัดเจน เมื่อหยุดให้สนามไฟฟ้าหลอดจะคืนรูปสู่ปกติ และสามารถยึดได้อีกเมื่อให้สนามไฟฟ้ากระแสสลับอีกครั้ง ซึ่งบางครั้งจะต่อกันเป็นโซ่เชื่อมระหว่างขั้วไฟฟ้า (100  $\mu\text{m}$ ) และหลอดสามารถคืนสู่รูปเดิมได้ถ้าความเข้มสนามไฟฟ้าไม่สูงเกินขีดจำกัดความยืดหยุ่นของเซลล์

Engelhardt และคณะ (1984) ได้คิดเทคนิคทางไฟฟ้าที่ทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปเป็นทรงรี เพื่อศึกษาคุณสมบัติความยืดหยุ่นภายใต้ความหนืดของเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยการวิเคราะห์ผลด้วยทฤษฎีการยึดตัวของโพรโทพลาสต์ทรงกลมเปลือกเดี่ยวเมื่อเซลล์แขวนลอยในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้า  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  และให้สภาพนำไฟฟ้าภายในเซลล์เป็น  $100 \text{ mS.m}^{-1}$  ให้สนามไฟฟ้าแบบไม่สม่ำเสมอในช่วงความถี่แมกซ์เวลล์-แวกเนอร์ คือ  $5 \times 10^5 \text{ Hz}$  -  $2 \times 10^6 \text{ Hz}$  ใช้ขั้วไฟฟ้าแบบสามเหลี่ยมให้เซลล์เกาะขั้วไฟฟ้าขั้วใดขั้วหนึ่งที่มีความเข้มสนามไฟฟ้า  $10 \text{ kV.m}^{-1}$  และเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $20 \text{ kV.m}^{-1}$  -  $100 \text{ kV.m}^{-1}$  ให้เซลล์อยู่

ในสนามไฟฟ้าขนาด 2.5 วินาที วิเคราะห์เวลาในการคืนรูปของเซลล์พบว่า มี 2 ช่วงคือช่วงเร็วและช่วงช้ามีค่าเป็น 0.1 วินาที และ 1 วินาที และค่าคงที่ของสปริงที่เซลล์ยืดได้สูงสุด (ประมาณ  $1 \mu\text{m}$ ) คือ  $7.4 \times 10^{-6} \text{ N.m}^{-1}$

ต่อมาในปี ค.ศ. 1988 Engelhardt และ Sackmann ได้วิเคราะห์แรงทางไฟฟ้าที่มีผลต่อการยึดตัวของเซลล์ช่วงความถี่แมกซ์เวลล์-แวกเนอร์โดยยึดเซลล์กับขั้วใดขั้วหนึ่งก่อนเช่นกันแล้วค่อยๆเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าด้วยสนามแบบพัลส์ พิจารณาตามแบบจำลองของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว เพื่อหาค่ามอดูลัสเฉือน ( $\mu$ ) และ ค่าความหนืดของเยื่อหุ้มเซลล์ ( $\eta$ ) พบว่าค่าเหล่านี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับผลทางกายภาพ ได้แก่ อายุของเซลล์ หรือเซลล์ที่ติดเชื้อโรค พบว่ามอดูลัสเฉือนมากกว่าเซลล์ปกติเป็นสามเท่า และผลทางชีวเคมีโดยการเพิ่มความแข็งแรงของสเปคตรินโดยใช้ ไควเลนที่ S-H ทำปฏิกิริยากับไอ-อะไมด์ ทำให้ค่า  $\mu$  และ  $\eta$  จะเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมถึงแปดเท่า

Gass และ Chernomordik (1990) ศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์ลูกวัวเซลล์อ่อนของหนู และเซลล์เยื่อเกี่ยวพันของหนู โดยให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่เหลี่ยม  $1.3 \text{ kV.m}^{-1}$  ช่วงพัลส์  $100 \mu\text{s}$  เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกดึงให้องค์ประกอบภายในยื่นออกมาหรือเรียกว่าเกิด bleb ซึ่งเซลล์จะไม่ตายและยังสามารถคืนรูปเดิมได้เมื่อหยุดให้สนามไฟฟ้า และคาดว่าขณะที่เซลล์เปลี่ยนรูปร่างจะเพิ่มความสามารถในการยอมให้สารผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์

Gass และคณะ (1991) ศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์เม็ดเลือดแดงในสนามไฟฟ้าความถี่สูง แต่มีวิธีการที่แตกต่างจากงานวิจัยอื่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้นคือไม่ให้เซลล์เกาะขั้วไฟฟ้าแบบบาง โดยให้สนามไฟฟ้าถึงเซลล์มาอยู่หน้าขั้วไฟฟ้า พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้า จะทำให้สปีคูลของเยื่อหุ้มเซลล์เอคซิโนไซต์ (echinocytes) ยึดออก และเมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $500 \text{ kV.m}^{-1}$  -  $550 \text{ kV.m}^{-1}$  พบว่าจะทำให้เซลล์เกิดการบวมและแตก กระบวนการนี้แรงเนื่องจากสนามไฟฟ้าภายนอกทำให้รูปร่างและโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไป ได้แก่ เกิดกระบวนการ filopodia-like ยึดออก นั่นคือส่วนที่เป็นโครงสร้างของเส้นใย และ lamella-like ซึ่งโดยปกติโครงสร้างเหล่านี้จะไม่เปลี่ยนรูปในเงื่อนไขปกติ วิธีการนี้เป็นการพัฒนาการศึกษาสมบัติความยืดหยุ่นของสปีคูล (spicule) ที่เยื่อหุ้มเซลล์เอคซิโนไซต์ อย่างไรก็ดีเมื่อหยุดให้สนามไฟฟ้า เอคซิโนไซต์จะคืนสู่สภาพปกติได้ หากให้สนามไฟฟ้าไม่เกิน 5 นาที

ต่อมาได้มีการพัฒนารูปแบบของขั้วไฟฟ้าเป็นทรงกระบอกแบบสมมาตรเพื่อความสะดวกในการยึดเซลล์ให้ติดกับขั้วไฟฟ้า โดยยังคงเลือกศึกษาช่วงความถี่ย่านกลางหรือแมกซ์เวลล์-แวกเนอร์ และเริ่มหันมาให้ความสนใจกับเซลล์ชีวภาพชนิดอื่นด้วย ได้แก่

Poznanski และคณะ (1992) ใช้ลวดแพลททินัมเป็นขั้วไฟฟ้า ให้เกาะขั้วไฟฟ้าขั้วใดขั้วหนึ่งด้วยแรงไดอิเล็กโตรฟอเรติกแล้วเพิ่มความเข้มข้นแบบขั้นบันได (stepwise) ศึกษาสมบัติไฟฟ้าเชิงกลของเซลล์รา *Neurospora crassa* โดยเสนอแบบจำลองเชิงกระแสของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียวและอาศัยการเปลี่ยนรูปของเซลล์ กำหนดความเค้นเฉือนของเยื่อหุ้มเซลล์ คาดว่าแบบจำลองนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์หาสมบัติเชิงกลของเซลล์ทรงกลม

Pawlowski และ Fikus (1993) วิเคราะห์การกระจายเชิงมุมของความเค้นดิ่งที่เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมของเยื่อหุ้มเซลล์เนื่องจากสนามไฟฟ้ากระแสสลับ พบว่าความเค้นดิ่งแปรผันตามพื้นที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์ และความเค้นขึ้นกับตำแหน่งของเยื่อหุ้มเซลล์ที่สัมพันธ์กับทิศของสนามไฟฟ้า กล่าวคือค่าความเค้นมีค่าสูงสุดบริเวณที่เป็นขั้วของเซลล์ นอกจากนี้พบว่าความเค้นขึ้นกับความเข้มข้นและความถี่สัญญาณไฟฟ้าของระบบ การศึกษานี้สามารถอธิบายผลของสนามไฟฟ้าต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งอาจนำไปสู่การทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ การรวมเซลล์ และการทำลายเซลล์ด้วยไฟฟ้า เป็นต้น นอกจากนี้ในปีเดียวกัน Pawlowski และคณะ (1993) ได้วิเคราะห์การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้ากระแสสลับตามแบบจำลองเชิงกระแส พบว่าการแตกของเซลล์ขึ้นกับความถี่สัญญาณไฟฟ้าและชนิดของเซลล์ เซลล์ถูกทำลายได้ง่ายในช่วงความถี่  $10^5$  Hz - 1 Hz ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์และการรวมเซลล์ด้วยไฟฟ้า

Mahaworasilpa (1992) ศึกษาการเปลี่ยนรูปของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและหนู โดยใช้ลวดนิเกิลอัลลอยด์เป็นขั้วไฟฟ้า พบว่าความเข้มข้นไฟฟ้า ความถี่ และเวลาที่เซลล์อยู่ในสนามไฟฟ้ามีผลต่อการยึดของเซลล์และเสนอแบบจำลองแรงดึงทางไฟฟ้าของทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว

Boal (1994) สร้างแบบจำลองเครือข่ายทางคอมพิวเตอร์เพื่อศึกษาสมบัติเชิงกลของไซโทสเกเลตันที่มีเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำนายค่ามอดูลัส 4 ค่าได้แก่ มอดูลัสเฉือน  $(10 \pm 2) \times 10^{-6} \text{ J.m}^{-2}$  มอดูลัสเชิงอัด  $(17 \pm 2) \times 10^{-6} \text{ J.m}^{-2}$  มอดูลัสเชิงปริมาตร  $(1.2 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ J.m}^{-2}$  และยังมีมอดูลัส  $(2.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ J.m}^{-2}$  โดยทำนายความหนาของเยื่อหุ้ม

เซลล์เป็น 15 nm

Marszalek และ Tsong (1995) ศึกษาการแตกตัวของเซลล์ (cell fission) และการเกิดเซลล์ขนาดเล็กของเซลล์ไข่เม่นทะเลโดยใช้สนามไฟฟ้ากระแสสลับช่วงความถี่วิทยุ ใช้ลวดแพลททินัมเป็นขั้วไฟฟ้าและให้เซลล์เกาะขั้วไฟฟ้าด้วยแรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก เพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $100 \text{ kV.m}^{-1}$  พบว่าทำให้เซลล์ยึดและแบ่งเซลล์เป็นสองส่วนคือเซลล์ขนาดใหญ่และเซลล์ขนาดเล็ก เมื่อหยุดให้สนามเซลล์จะหดตัวและแยกจากกันเป็นสองส่วนได้โดยไม่แตก

Krueger และ Thom (1997) ศึกษาการเปลี่ยนรูปและเสถียรภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงในสนามไฟฟ้ากระแสสลับความถี่สูง เลือกช่วงความถี่ 100 kHz ถึง 1 MHz โดยเปรียบเทียบผลที่อุณหภูมิห้อง  $25^{\circ}\text{C}$  กับที่อุณหภูมิต่ำ ( $0^{\circ}\text{C}$ - $15^{\circ}\text{C}$ ) ให้ความเข้มสนามไฟฟ้าตั้งแต่  $0$  -  $18 \text{ kV.m}^{-1}$  พบว่าที่อุณหภูมิต่ำเซลล์ยึดตัวได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิสูง และคาดว่า การเกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์และการเจริญเติบโตเกิดขึ้นได้น้อยที่อุณหภูมิต่ำ

### 1.2.5 ผลกระทบของไฟฟ้าต่อโพรโทพลาสต์ชีวภาพ

#### ก. ผลกระทบต่ออกลไกของระบบ

Palaniappan และคณะ (1990) ได้รวบรวมงานวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของไฟฟ้าต่ออกลไกภายในของเซลล์ชีวภาพดังนี้

1 ผลกระทบเชิงกล (mechanical effects) Shimada and Shimahara (1985b) ได้เสนอผลกระทบเนื่องจากไฟฟ้ากระแสตรง แรงดันพัลส์ที่ศักย์สูงซึ่งเกิดขึ้นทันทีทันใด เป็นผลให้เกิดคลื่นช็อก (shock wave) แต่คลื่นช็อกจะไม่เกิดถ้าให้สนามไฟฟ้ากระแสสลับที่ศักย์ต่ำ ๆ

2 ผลกระทบทางเคมี (chemical effects) Martin (1960) ; Brandt และคณะ (1962) และ Edebo (1968) เสนอปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียตาย ระหว่างการให้ศักย์สูง ได้แก่ ออกซิเจนและไฮโดรเจนอิสระ อนุมูลของไฮดรอกซิด และไฮโดรเปอร์ออกซิด และไอออนของโลหะจากขั้วไฟฟ้า จะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือปฏิกิริยายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งปฏิกิริยาเคมีดังกล่าว ขึ้นกับชนิดของเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ปริมาณของอาหารที่ใช้ และชนิดของขั้วไฟฟ้า

3 ผลกระทบทางความร้อน (thermal effects) Biss และคณะ (1987) และ Skudder (1988) พบว่าเมื่อเซลล์แขวนลอยในอาหาร ระหว่างการให้ศักย์พัลส์ พบว่าไม่มี

เซลล์ตาย และอุณหภูมิของระบบเพิ่มขึ้นเพียง 2-3°C แต่เมื่อให้สนามไฟฟ้ากระแสสลับศักย์ต่ำๆแก่เซลล์ซึ่งนำไฟฟ้าได้จะทำให้เกิดความร้อน อาจเป็นเหตุให้เซลล์ตายและเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์.

#### ข. ผลของไฟฟ้าต่อการเกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์

Ho และ Mittal (1996) เสนอว่าการศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าค่าสูงต่อเซลล์ชีวภาพซึ่งแขวนลอยอยู่ในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้าต่ำ เป็นอีกหนึ่งในหลายๆ เรื่องที่นักวิจัยทางด้านชีวฟิสิกส์และเทคโนโลยีชีวภาพให้ความสนใจ การให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ทำให้รูบนเยื่อหุ้มเซลล์ขยายใหญ่ขึ้น และยอมให้สารผ่านได้เพิ่มมากขึ้นชั่วคราว ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ต้องทราบในการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยไฟฟ้ามี 4 เรื่องได้แก่ 1. การวัดศักย์เยื่อหุ้มเซลล์ 2. จลศาสตร์ของการเกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ลำดับเวลา คุณสมบัติของรูที่เกิดขึ้นเนื่องจากไฟฟ้า ขนาดและโครงสร้างของรู และจำนวนรู 3. การยอมให้สารผ่านและทฤษฎีการแตก 4. ผลที่ตามมาได้แก่ ระยะเวลาเจริญเติบโตของเซลล์ ชนิดของไอออนและอุณหภูมิ เป็นต้น นอกจากนี้มีนักวิจัยหลายกลุ่ม นำเทคนิคการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ ไปประยุกต์ใช้กับงานด้านชีวเคมี พันธุวิศวกรรม ได้แก่ การถ่ายโอนยีน เข้าสู่เซลล์ ขณะที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูเนื่องจากสนามไฟฟ้าแบบ DC พัลส์ (Wolf, *et al.*, 1994 ; Sukharev, *et al.*, 1992 ; Klenchin, *et al.*, 1991 ; Xie and Tsong, 1990 และ Chu, *et al.*, 1987)

#### ก. ผลของไฟฟ้าต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ชีวภาพ

จากการศึกษาการเกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยน ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความสามารถในการยอมให้สารผ่านเพิ่มมากขึ้น Serpersu และ Tsong (1984) พบว่าสนามไฟฟ้ากระแสสลับมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase ที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การดูดกลืน Rb<sup>+</sup> ซึ่งเป็นไอออนที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ K<sup>+</sup> ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเพิ่มมากขึ้น และพบว่าการเคลื่อนที่ของไอออนขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้าและความถี่ กล่าวคือ Rb<sup>+</sup> แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้มากที่สุดที่ความถี่ 1 kHz ความเข้มสนามไฟฟ้า 2 kV.m<sup>-1</sup> จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจผลสนามไฟฟ้ากระแสตรงและกระแสสลับต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ชีวภาพ ในที่นี้จะยกตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาด้วยสนามไฟฟ้ากระแสสลับ ซึ่งได้แก่ Cogalniceanu และคณะ (1998) ทดลองกระตุ้นเซลล์ *Nicotiana tabacum* ด้วยสนามไฟฟ้ากระแสสลับที่ความเข้มสนาม และความถี่ต่างๆ พบว่าแคลด์สจะเจริญเติบโตในอาหารสำหรับชักนำให้เกิดยอด ภายใต้กระแสไฟฟ้า 0.1  $\mu$ A

ถึง 50  $\mu$ A ที่ความถี่ 50 Hz โดยการใช้หลอดแพลททินัมเป็นขั้วไฟฟ้า ที่ด้านหนึ่งปักเข้าไปใน แคลลัส ส่วนอีกอันจุ่มในอาหารเป็นเวลา 30 วัน พบว่าชุดที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า 50  $\mu$ A มีจำนวนยอดเพิ่มขึ้นถึง 300% แสดงว่าสนามไฟฟ้าอาจมีผลต่อการกระตุ้นให้เซลล์ ไวต่อสัญญาณทางเคมี (ฮอร์โมนหรือไอออน) ในอาหารเพาะเลี้ยง

Nakanishi และคณะ (1998) พบว่าเมื่อให้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ 100 mA แก่เซลล์ยีสต์มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโต และการผลิตแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม 2-3 เท่า Muraji และคณะ (1998) ศึกษาผลของสนามแม่เหล็กไฟฟ้ากระแสสลับ ที่ความถี่ต่างกันต่ออัตราการเจริญในขั้นแรกของเมล็ดข้าวโพด *Zea mays* พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ขึ้นกับความถี่ เมื่อให้สนามแม่เหล็กไฟฟ้ากระแสสลับขนาด 5 mT ความถี่ 200 Hz มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อให้ความถี่เพิ่มขึ้นเกิน 240 Hz จะยับยั้งการเจริญเติบโตของราก จุติพร (2541) พบว่าเมื่อให้เซลล์แพลงก์ตอนพืชน้ำเค็มอยู่ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับเป็นระยะเวลาหนึ่ง เซลล์เจริญเติบโตกว่าปกติ และจากการศึกษาของ Serpersu และ Tsong (1984) ช้างคั้น พบว่าสนามไฟฟ้ากระแสสลับมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เชื่อมหุ้มเซลล์ จึงทำให้คาดหวังว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้าจะมีผลต่อการดูดซึมอาหาร

จากการศึกษาเบื้องต้นของการยอมให้สารผ่านของโพรโทพลาสต์หลังถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าโดยวิธีย้อมสีเซลล์ด้วยสารเรืองแสง Rh123 (Rhodamine123) และ FITC (fluorescein isothiocyanate) ตั้งเกิดการยอมให้สารทั้งสองชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จากการเรืองแสงหลังจากย้อมสีเซลล์ พบว่าสารเรืองแสงทั้งสองชนิดให้ผลไม่แตกต่างกัน ระหว่างเซลล์ที่ให้สนามไฟฟ้าและไม่ให้สนามไฟฟ้า นอกจากนี้พบว่าโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ประมาณ 20 วัน และไม่สามารถติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์หลังเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าได้ เพราะมีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อน และวิธีที่นิยมใช้ในการติดตามการแลกเปลี่ยนสารผ่านเข้าออกเซลล์ได้แก่วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เพื่อติดตามการแพร่ของสารเข้าสู่เซลล์ ขณะให้สนามไฟฟ้า (Dimitrov and Sower, 1990) และอีกวิธีคือไอโซโทปรังสี (Serpersu and Tsong, 1984 และ Chernomordik, et al., 1990)

งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาการดูดซึมอาหารของโพรโทพลาสต์หลังการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าโดยวิธีไอโซโทปรังสี เนื่องจากสามารถบอกความแตกต่างของปริมาณรังสี

ที่เข้าสู่โพรโทพลาสต์ได้

### 1.3 วัตถุประสงค์

- 1.3.1 ศึกษาพฤติกรรมของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ
- 1.3.2 ศึกษาผลของสนามไฟฟ้ากระแสสลับต่อการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์
- 1.3.3 ประมาณค่าคงที่ของการยืดหยุ่น ( $K$ ) และค่าขึงมอดูลัส ( $Y$ ) โดยอาศัยทฤษฎีการเปลี่ยนรูปของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียวในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ
- 1.3.4 ศึกษาผลของสนามไฟฟ้ากระแสสลับต่อการดูดซึมฟอสเฟตของโพรโทพลาสต์

## บทที่ 2

### ทฤษฎี

วัตถุทุกชนิดแม้จะมีความแกร่งหรือแข็งแรงเพียงใดเมื่อถูกแรงภายนอกมากระทำ อาจเป็นแรงดึง แรงอัด แรงบิด หรือแรงกด วัตถุสามารถเปลี่ยนรูปไปได้ ในขณะที่เดียวกันจะมีแรงภายในระหว่างอะตอมของวัตถุเองพยายามต้านการเปลี่ยนแปลงนั้น (restoring force) ด้วยขนาดเท่ากับแรงภายนอกเพื่อจะดึงวัตถุกลับสู่สภาพเดิมเมื่อแรงภายนอกที่กระทำต่อวัตถุหมดไป เรียกความสามารถของวัตถุในการคืนสู่สภาพเดิมนี้อีกว่า สมบัติความยืดหยุ่นของวัตถุ และถ้าวัตถุสามารถคืนรูปเดิมได้ทุกประการเมื่อหมดแรงกระทำแล้วเรียกว่า วัตถุมีความยืดหยุ่นอย่างสมบูรณ์ หากวัตถุเสียรูปไปอย่างถาวรไม่สามารถคืนรูปเดิมได้เรียกวัตถุนั้นว่าไม่ยืดหยุ่น ซึ่งได้ทำการศึกษา และทดลองโดยโรเบิร์ต ฮุก (Robert Hooke) ในงานวิจัยนี้ แรงที่ทำให้เซลล์ยืดหยุ่นคือแรงจากขั้วไฟฟ้าทรงกระบอกขนาน ซึ่งจะสัมพันธ์กับค่าคงที่ของการยืดหยุ่นตามกฎของฮุก จะกล่าวถึงแต่ละส่วนพอสังเขป ดังนี้

#### 2.1 กฎของฮุก (Hooke's Law)

กฎของฮุกกล่าวว่า วัตถุบางชนิดมีความยืดหยุ่นอย่างสมบูรณ์ หากถูกแรงกระทำภายในขอบเขตจำกัด พอจะสรุปได้ว่าภายในขอบเขตของการยืดหยุ่นนั้นแรงกระทำจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับการเปลี่ยนรูปของวัตถุ กฎของฮุกจะเป็นจริงอยู่ในขอบเขตจำกัดเรียกว่าอยู่ในช่วงขีดจำกัดสัดส่วน (proportional limit) ถ้าแรงที่กระทำเลขช่วงดังกล่าว วัตถุไม่สามารถคืนสู่สภาพเดิมได้เรียกว่า ขีดจำกัดยืดหยุ่น (elastic limit) หรือ จุดคราก (yield point) และจุดแตกหัก (fracture point) เรียกบริเวณระหว่างจุดครากและจุดแตกหักว่า บริเวณพลาสติก (plastic region) การเปรียบเทียบสมบัติความยืดหยุ่นของวัตถุจะพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของแรงที่กระทำต่อหน่วยพื้นที่ หรือเรียกว่า ความเค้น (stress) กับผลการเปลี่ยนขนาดหรือรูปร่างของวัตถุเนื่องจากมีแรงมากระทำเรียกว่า ความเครียด (strain) ในความสัมพันธ์นี้เรียกว่า โมดูลัสของความยืดหยุ่น (elastic modulus) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างความเค้นและความเครียด (สมพงษ์, 2541) แต่งานวิจัยนี้จะมีแรงกระทำต่อเซลล์ในทิศทางเดียว คือตามทิศของสนามไฟฟ้า ซึ่งแรงนี้เป็นแรงดึงที่ทำให้พื้นที่หน้าตัดของเซลล์เปลี่ยนจากทรงกลมเป็น

ทรงรี สามารถหาความสัมพันธ์ของความเค้นดึง ( $F/A$ ) ต่อความเครียดดึง ( $\Delta l/l$ ) หรือ ที่เรียกว่า โมดูลัสของยัง (Young's modulus "Y") โดยที่  $F$  เป็นแรงดึงตามแนวยาวและมีทิศตั้งฉากกับพื้นที่ภาคตัดขวางของวัตถุ  $A$  และทำให้วัตถุที่มีความยาว  $l$  ยืดออกไปจากเดิม  $\Delta l$

นอกจากนี้ภายในวัตถุจะมีแรงยึดเหนี่ยวของโมเลกุลต้านกับแรงภายนอกเพื่อดึงให้วัตถุคืนสู่สภาพเดิม แรงนี้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการขจัด  $x$  ดังสมการ

$$\vec{F} = -K\vec{x} \quad (1)$$

เมื่อ  $K$  เป็นค่าคงที่ของการยืดหยุ่นของวัตถุ

## 2.2 แรงกระทำต่อเซลล์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ

Pohl (1978) แสดงให้เห็นว่าแรงไฟฟ้าทำให้เซลล์ชีวภาพเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่มีความเข้มสนามไฟฟ้าสูงกว่า เรียกว่า แรงไดโพลีโทรฟอเรติกชนิดบวก อันเป็นผลจากอันตรกิริยาระหว่างสนามไฟฟ้า ( $E$ ) กับไดโพลโมเมนต์ของเซลล์ ( $\mu$ ) ดังนี้

$$\vec{F} = (\mu) \cdot \nabla \vec{E} \quad (2)$$

Kaler และ Jones (1990) ได้แสดงแรงไฟฟ้าที่มีผลต่อเซลล์ทรงกลมเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ ที่สัมพันธ์กับค่าจริงของไดโพลโมเมนต์

$$\vec{F}_{DEP} = \text{Re}[\mu(\omega)] \cdot \nabla \vec{E} \quad (3)$$

เมื่อ  $\nabla$  เป็นตัวดำเนินการทางคณิตศาสตร์เรียกว่าเกรเดียนท์ หรือเดล (gradient or del) ในทางฟิสิกส์หมายถึง อัตราการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเวกเตอร์ใดๆ ต่อตำแหน่ง

โดย  $\mu(\omega)$  เป็น ค่าขึ้นกับความถี่ มีหน่วยเป็น C.m

$E$  คือสนามไฟฟ้าภายนอกมีหน่วยเป็น  $V.m^{-1}$

ดังนั้น  $F_{DEP}$  จึงมีหน่วยเป็น  $C.V.m^{-1}$  หรือ N

Pohl (1978) ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสนามไฟฟ้ากับฟังก์ชันความถี่ ซึ่ง  
 ให้ความได้โพลโมเมนต์ดังนี้

$$\bar{\mu}(\omega) = 4\pi R^3 \epsilon_s f(\omega) \bar{E} \quad (4)$$

ในกรณีขั้วไฟฟ้าแบบทรงกระบอกคู่ขนาน Mahaworasilpa และคณะ (1994) เขียน  
 สมการ  $F_{DEP}$  ในรูปใหม่ได้ว่า

$$\bar{F}_{DEP} = 2\pi \epsilon_s R^3 \text{Re}[f(\omega)] \nabla(\bar{E}^2) \quad (5)$$

เมื่อ  $\text{Re}[f(\omega)]$  เป็นส่วนจริงของฟังก์ชันความถี่เชิงซ้อน ซึ่งในห้องปฏิบัติการวิจัยนี้ได้  
 ศึกษาค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  ของเซลล์โพโรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. (สรวิทย์, 2541) โดยประมาณค่า  
 คงที่ทางไฟฟ้าไว้ 4 ค่าได้แก่ สภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม สภาพยอมทางไฟฟ้าของ  
 เยื่อเซลล์ สภาพยอมทางไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม และ ความหนาของเยื่อเซลล์ ( $\sigma_c$ ,  $\epsilon_m$ ,  $\epsilon_c$   
 และ  $\delta$  ตามลำดับ) งานวิจัยนี้จึงอิงค่าคงที่ทั้ง 4 เพื่อนำมาหาค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  ที่เหมาะสมกับ  
 เซลล์ไซโทพลาสซึม

นอกจากนี้แรงยังมีค่าขึ้นกับ เกรเดียนท์ของ  $E^2$  สำหรับขั้วไฟฟ้าแบบทรงกระบอกคู่ขนาน  
 Mahaworasilpa และคณะ (1994) ได้แสดงให้เห็นว่าสนามไฟฟ้ามีค่าขึ้นกับรูปทรงเรขาคณิต  
 ดังนี้

$$\bar{E}_{(y,z)} = \frac{Vd}{2 \ln\left(\frac{d-a}{a}\right)} \left[ \frac{\hat{E}_y}{\frac{d^2}{4} + y^2} + \frac{\hat{E}_z}{\frac{d^2}{4} - z^2} \right] \quad (6)$$

เมื่อ  $V$  คือศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบ (V)

$d$  คือ ระยะห่างที่วัดจากศูนย์กลางของขั้วไฟฟ้า (m)

$a$  คือ รัศมีของขั้วไฟฟ้า (m)

$y$  และ  $z$  คือ ตำแหน่งที่วัดจากระนาบศูนย์กลางขั้วไฟฟ้า (equatorial plane) ในทิศแกน  $y$  และ  $z$  ตามลำดับ เซลล์จะเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่มีความเข้มสนามไฟฟ้าสูง กล่าวคือ ในแนวระนาบศูนย์กลางขั้วไฟฟ้าหรือแนวแกน  $z$  และเคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วไฟฟ้าซึ่งมีความเข้มสนามสูงสุด การทดลองนี้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปของเซลล์ขณะเกาะขั้วไฟฟ้า ดังนั้นค่าสนามที่ใช้จึงพิจารณาเฉพาะแนวแกน  $z$  เท่านั้น จากสมการที่ (6) แยกเขียนเฉพาะเทอมของแนวแกน  $z$  ได้ดังนี้

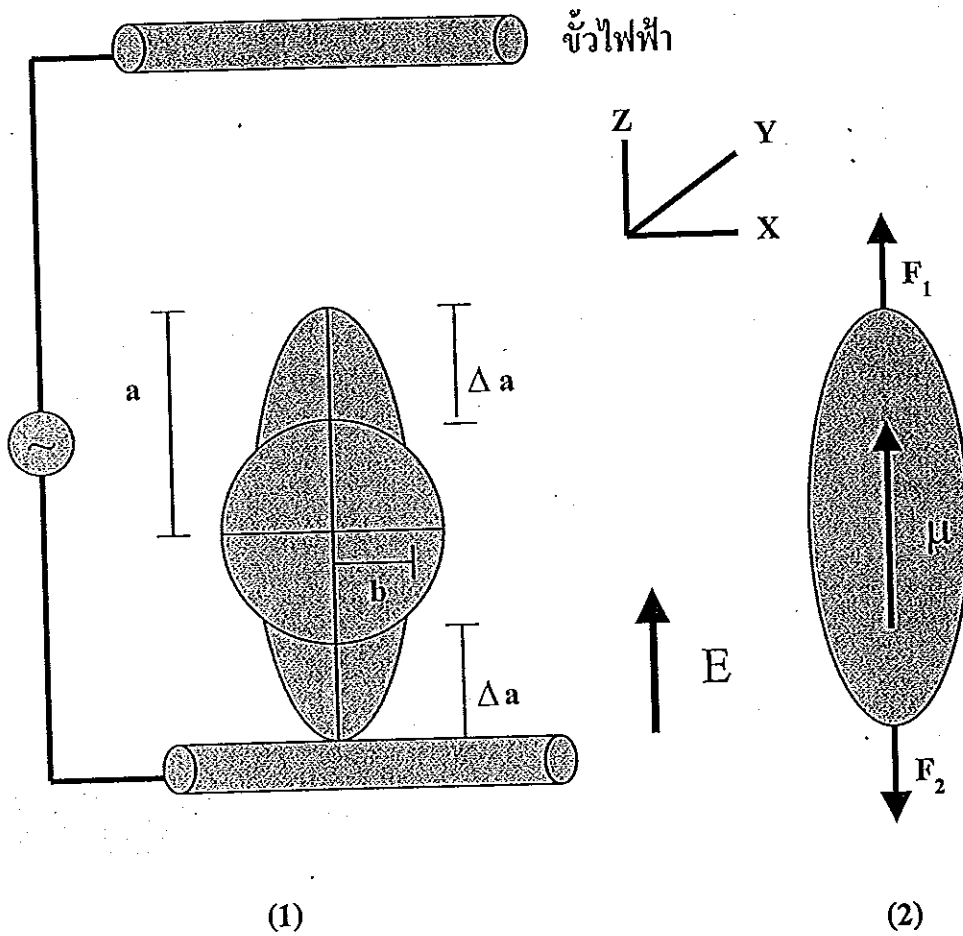
$$E(z) = \frac{Vd}{\left[ 2 \ln \left( \frac{d-a}{a} \right) \right] \left[ \frac{d^2}{4} - z^2 \right]} \quad (7)$$

### 2.3 การยึดของเซลล์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ

Mahaworasilpa (1992) ได้ศึกษาผลของสนามไฟฟ้าต่อการเปลี่ยนแปลงรูปของเซลล์หลังจากที่เซลล์เกาะขั้วไฟฟ้าพบว่า การยึดขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้าและความถี่ซึ่งส่งผลให้ไดโพลโมเมนต์ที่ถูกเหนี่ยวนำภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และอันตรกิริยาระหว่างไดโพลโมเมนต์กับสนามไฟฟ้าจึงทำให้เพิ่มแรงกระทำต่อเซลล์ด้วย และเสนอขนาดของแรงกระทำต่อเซลล์ขณะเกาะขั้วไฟฟ้า  $\mu E \cos \theta$  เมื่อ  $\theta$  เป็นทิศทางของไดโพลโมเมนต์ ( $\mu$ ) ที่กระทำกับทิศของสนามไฟฟ้า ( $E$ ) จะเห็นว่าทิศทางที่แรงกระทำสูงสุด (elongation force :  $F_e$ ) เมื่อ  $\mu$  มีทิศเดียวกับสนาม  $E$  ซึ่งตรงกับแนวตั้งฉากกับขั้วไฟฟ้า (ภาพประกอบ 5) ซึ่งสมการแรงกระทำต่อเซลล์บนขั้วไฟฟ้าคือ

$$F_e = 8\epsilon_r \text{Re}[f(\omega)] E^2 R^2 \quad (8)$$

แรงนี้ Engelhardt และ Sackmann (1988) เรียกว่าแรง Maxwell tension



ภาพประกอบ 5 การยืดของเซลล์เนื่องจากแรงดึงทางไฟฟ้า

$a$  เป็นความยาวครึ่งแกนเอก (semi-major)  
 $b$  เป็นความยาวครึ่งแกนโท (semi-minor)

(1) แสดงการยืดของเซลล์จากทรงกลมเป็นทรงรี

(2) แสดงทิศทางของไดโพลโมเมนต์ที่เสริมกับสนามไฟฟ้าทำให้เกิดแรงดึง  $F_1$  และ  $F_2$  ต่อเซลล์

เมื่อเซลล์ยึดตัว Engelhardt และ Sackmann (1988) เสนอว่าจะมีแรงคืนตัวในขณะเดียวกันตามกฎของฮุค บางส่วนของแรงคืนตัวนี้อาจเกิดจากความเค้นในไซโทสเกลลิตอน (cytoskeleton) และโปรตีนที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าไซโทสเกลลิตอนและโปรตีนเหล่านี้เป็นสมบัติเฉพาะของเซลล์ชนิดหนึ่งๆจึงกล่าวได้ว่าการยึดหยุ่นของเซลล์ใช้บอกเสถียรภาพของเซลล์ได้ แสดงว่าเซลล์จะมีแรงคืนตัวต่างกันในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ค่าคงที่ของการยึดหยุ่น  $K$  จะสัมพันธ์กับค่ามอดูลัสของการยึดหยุ่นของเซลล์และขึ้นอยู่กับขนาดเซลล์ เมื่อให้แรงในการยึดตัว ( $F$ ) เท่ากับแรงยึดหยุ่นของการคืนตัว ( $F_K = 2\Delta a \cdot K$ ) ได้ว่า

$$K(2\Delta a) = 8\epsilon_s \operatorname{Re}[f(\omega)] R^2 E^2 \quad (9)$$

หรือ

$$\Delta a = \frac{4\epsilon_s \operatorname{Re}[f(\omega)] R^2 E^2}{K} \quad (10)$$

$$R + \Delta a = \frac{4\epsilon_s \operatorname{Re}[f(\omega)] R^2 E^2}{K} \quad (11)$$

$$\frac{R + \Delta a}{R} = 1 + \frac{4\epsilon_s \operatorname{Re}[f(\omega)] R E^2}{K} \quad (12)$$

เมื่อ  $R + \Delta a = a$  ดังนั้น

$$\frac{a}{R} = 1 + \frac{4\epsilon_s \operatorname{Re}[f(\omega)] R E^2}{K} \quad (13)$$

แม้ว่าเซลล์จะเปลี่ยนรูปไปเป็นทรงรีแต่ปริมาตรเซลล์ยังคงเดิม จึงเขียนความสัมพันธ์ได้ว่า

$$\frac{4}{3} \pi R^3 = \frac{4}{3} \pi a b^2 \quad (14)$$

$$R^3 = ab^2 \quad (15)$$

แทนค่า R จากสมการที่ (15) ในสมการที่ (13) จะได้ว่า

$$\frac{a}{b} = \left( 1 + \frac{4\varepsilon_s \operatorname{Re}[f(\omega)]RE^2}{K} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (16)$$

สมการ (16) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของ a/b กับค่าสนามไฟฟ้า E และสามารถเขียนใหม่ได้ดังนี้

$$K = \frac{4\varepsilon_s \operatorname{Re}[f(\omega)]RE^2}{(a/b)^{2/3} - 1} \quad (17)$$

สมการที่ (17) นำมาประมาณค่า K ได้เมื่อทราบสัดส่วนการยืดของเซลล์ a/b และค่า  $\operatorname{Re}[f(\omega)]$

Mahaworasilpa (1992) พิจารณาความสัมพันธ์ของความเค้นและความเครียดของเซลล์ทรงกลมเปลือกเซลล์บาง หรือเรียกว่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus แทนด้วย Y) เขียนความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$\frac{\text{Elongation force}}{\text{Cross Sectional area}} = Y \cdot \frac{\text{Change in Cell major axis}}{\text{Cell major axis}}$$

$$\frac{F_k}{\pi b^2} = Y \frac{\Delta a}{a} \quad (18)$$

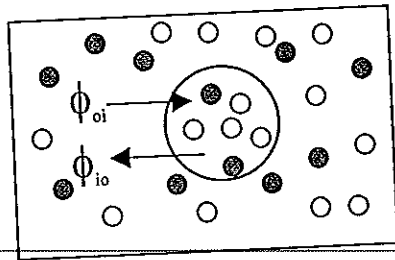
แทน  $F_k = 2\Delta a \cdot K$  ลงในสมการที่ (18) จะได้ว่า

$$Y = \frac{2K \cdot a}{\pi b^2} \quad (19)$$

การศึกษานี้มีวิธีการทดลองหลักอยู่สองขั้นตอน คือขั้นแรกยึดเซลล์กับขั้วไฟฟ้าโดยให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วไฟฟ้าภายใต้แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติกที่ค่าสนามไฟฟ้าอ่อนๆ ซึ่งไม่ทำให้เซลล์เปลี่ยนรูป (Engelhardt, *et al.*, 1984 ; Engelhardt and Sackmann, 1988 ; Mahaworasilpa, 1992 ; Marszalek and Tsong, 1995 และ Krueger and Thom, 1997) ขั้นที่สองเพิ่มความเข้มข้นไฟฟ้าเพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนรูปของเซลล์ที่ความเข้มข้นไฟฟ้า ความถี่ และ สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายต่างกัน

#### 2.4 การดูดซึมสารอาหารโดยใช้ไอโซโทปรังสี

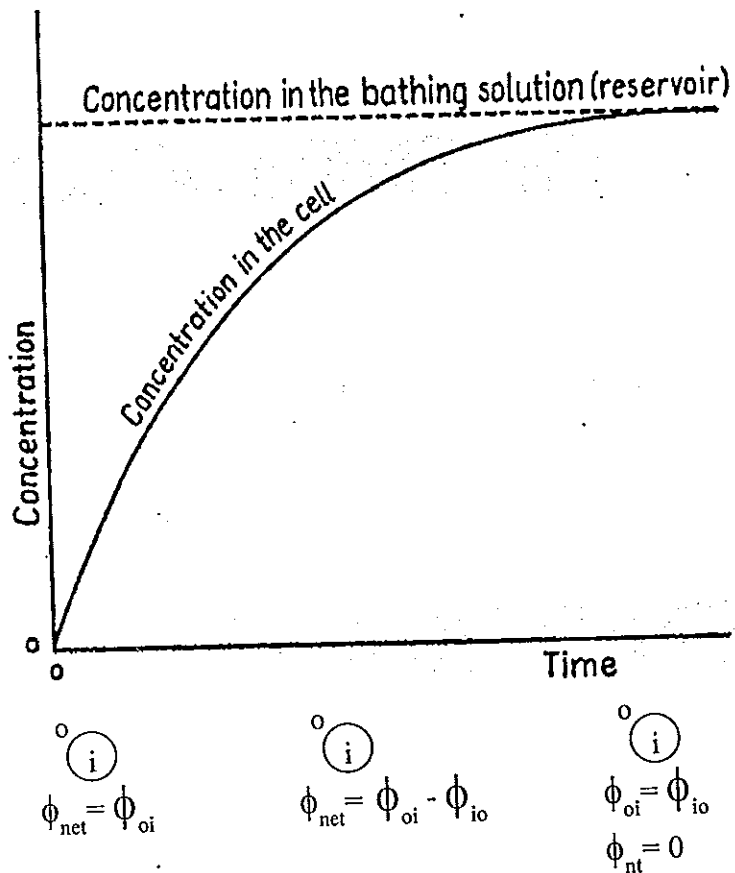
เป็นที่ทราบกันแล้วว่า เยื่อหุ้มเซลล์เป็นตัวกั้นระหว่างสารละลายภายในและภายนอกเซลล์โดยมีสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ปริมาณไอออนที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ในหน่วยโมลต่อหน่วยเวลาเรียกว่าฟลักซ์ แทนด้วยสัญลักษณ์  $\phi$  การศึกษาการดูดซึมอาหารของเซลล์สามารถบอกได้ในรูปของฟลักซ์ ซึ่ง Cerijido และ Rotunno (1970) ได้เสนอวิธีการวัดฟลักซ์ในระบบสิ่งมีชีวิต ด้วยการทำเครื่องหมายเซลล์หรือการติดตามเซลล์ที่ศึกษาด้วยสารกัมมันตรังสี โดยมีข้อจำกัดว่าไอออนที่สนใจต้องเป็นชนิดที่เซลล์ต้องการและเซลล์ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นไอออนที่เสถียรหรือไม่เสถียรภาพ (ภาพประกอบ 6) แสดงการแลกเปลี่ยนสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อแวนกอยเซลล์ในสารละลายที่ติดตามรังสี



ภาพประกอบ 6 การแลกเปลี่ยนไอออนที่เสถียร (○) และไม่เสถียร (●) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

เมื่อ  $\phi_{oi}$  เป็นฟลักซ์ของไอออนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จากภายนอกสู่ภายในเซลล์  
 $\phi_{io}$  เป็นฟลักซ์ของไอออนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จากภายในสู่ภายนอกเซลล์  
 เริ่มต้น  $\phi_{io}$  เป็นศูนย์ แล้วมีการแลกเปลี่ยนไอออนจากภายในสู่ภายนอกเซลล์ จะทำให้  $\phi_{io}$  มีค่าเพิ่มขึ้นจากนั้นเมื่อความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์เริ่มสมดุล

$\phi_{io} = \phi_{oi}$  และ  $\phi_{net}$  จะเป็นศูนย์ (ภาพประกอบ 7)



ภาพประกอบ 7 การเพิ่มของปริมาณรังสีในเซลล์ภายในเวลา T

ที่มา : Cereijido and Rotunno, 1970. หน้า 50.

จากภาพประกอบ 7 แสดงการดูดกลืนสารรังสีเข้าสู่เซลล์ทำให้สามารถหาปริมาณรังสีในเซลล์ได้ตามช่วงเวลาของการดูดกลืน โดยการเปรียบเทียบฟลักซ์เข้าและออกจากเซลล์

จากการใช้สารกัมมันตรังสีติดตามการเคลื่อนที่ของไอออนที่สนใจ Aramratana และ Scott (1987) ได้เสนอแบบจำลองเชิงคณิตศาสตร์ของการดูดซึมอาหารผ่านชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ของไซโทพลาสซึม แวกคิวโอด และท่อลำเลียงอาหารไว้ดังนี้

$$\frac{dY_c}{dt} = (S_o\phi_{oc} + S_v\phi_{vc} + S_x\phi_{xc}) - S_c(\phi_{co} + \phi_{cv} + \phi_{cx}) \quad (20)$$

เมื่อ  $Y$  เป็นอัตรานับรังสี (cph)

$S_n$  เป็นความแรงรังสีจำเพาะในแต่ละส่วน

$n$  แทนส่วนประกอบต่างๆ ของแบบจำลอง (cph.mol<sup>-1</sup>)

$\phi$  แทนฟลักซ์ (mol.h<sup>-1</sup>)

$O$  แทนส่วนของสารละลายภายนอกเซลล์

$C, V$  แทนส่วนของไซโทพลาสซึมและแวกคิวโอด ตามลำดับ

$X$  แทนส่วนของไซเต็มหรือท่อลำเลียง

สำหรับเซลล์ทรงกลมของโพรโทพลาสต์ใบพืช ซึ่งมีเยื่อหุ้มเซลล์เพียงชั้นเดียวสามารถเขียนสมการ (20) ได้ใหม่ดังนี้

$$\frac{dY_i}{dt} = S_o\phi_{oi} - S_i\phi_{io} \quad (21)$$

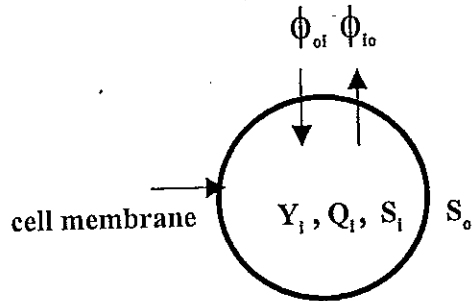
เมื่อ  $Y_i$  เป็นจำนวนนับรังสีในเซลล์ (cph)

$dY_i/dt$  อัตราการสะสมปริมาณรังสีในเซลล์ เมื่อทิ้งให้เซลล์ดูดซึมสารกัมมันตรังสีเป็นเวลา  $T$  ชั่วโมง

$S_o$  เป็นความแรงรังสีจำเพาะของสารละลายภายนอกเซลล์ที่ติดฉลากรังสี (cph.mol<sup>-1</sup>)

$S_i$  เป็นความแรงรังสีจำเพาะภายในเซลล์ (cph.mol<sup>-1</sup>) โดยคิดว่าภายในเซลล์มีปริมาณไอออนชนิดที่สนใจอยู่  $Q$  โมล และกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอซึ่งหาได้

จากความสัมพันธ์  $S_i = Y_i/Q$  พิจารณาภาพประกอบ 8 แสดงแบบจำลองการแลกเปลี่ยนสารของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์เพียงชั้นเดียว



ภาพประกอบ 8 แบบจำลองการแลกเปลี่ยนสารของเซลล์ทรงกลม

จากสมการที่ (21) เมื่อพิจารณาที่สภาวะสมดุล  $\phi_{oi} = \phi_{io} = \phi$  และ  $S_i = Y_i/Q_i$  จะได้ว่า

$$\frac{dY_i}{dt} = (S_o\phi - \frac{Y_i}{Q_i}\phi) \quad (22)$$

$$\frac{dY_i}{dt} = \frac{\phi}{Q_i}(S_oQ_i - Y_i) \quad (23)$$

$$\frac{dY_i}{(S_oQ_i - Y_i)} = \frac{\phi}{Q_i} dt \quad (24)$$

เมื่ออินทิเกรตจะได้ว่า

$$\frac{\phi \cdot t}{Q_i} = -\ln(S_oQ_i - Y_i) + C \quad (25)$$

ที่  $t=0, Y_i=0$  จะได้ค่าคงที่  $C = \ln(S_oQ_i)$  และ ที่สภาวะสมดุล  $\phi$  มีค่าคงที่ ดังนั้น  $\phi/Q_i$  เป็นค่าคงที่ของอัตราการแลกเปลี่ยน แทนด้วย  $k$  เขียนสมการ (25) ใหม่ได้เป็น

$$\ln(S_oQ_i - Y_i) - \ln(S_oQ_i) = -kt \quad (26)$$

$$\ln\left(\frac{S_0 Q_i - Y_i}{S_0 Q_i}\right) = -kt \quad (27)$$

จะได้ว่า

$$Y_i = S_0 Q_i (1 - e^{-kt}) \quad (28)$$

ในงานวิจัยนี้ไม่ต้องการหา  $S_i$  ในขณะใดๆ แต่ต้องการหาฟลักซ์สุทธิขณะใดๆ ที่สนใจ เพื่อเปรียบเทียบระหว่างโพรโทพลาสต์ที่ถูกเหนี่ยวนำในสนามไฟฟ้ากับชุดควบคุมจึงจำเป็นต้องหาสมการฟลักซ์ พิจารณาสมการ (28) โดยปกติค่าคงที่  $k$  จะมีค่าน้อยๆ และการทดลองนี้ให้ช่วงเวลาในการดูดซึมรังสีน้อยด้วย คือ 3 ชั่วโมง จึงทำให้  $kT \ll 1$  ดังนั้น  $\exp(-kt) \approx (1 - kT)$  แทนค่าในสมการ (28) จะได้ว่า

$$Y_i = S_0 Q_i (kT) \quad (29)$$

เมื่อ  $k = \phi/Q_i$  จากสมการ (29) เขียนใหม่ได้เป็น

$$Y_i = S_0 \phi T \quad (30)$$

ดังนั้นสมการฟลักซ์สุทธิขณะใดๆ ที่สนใจคือ

$$\phi = \frac{Y_i}{S_0 T} \quad (31)$$

การเปลี่ยนแปลงของ  $Y_i$  เทียบกับเวลาจะสลับซับซ้อนกว่านี้มากเพราะไม่สามารถทำการวัดจากโพรโทพลาสต์เดี่ยวๆ ได้ เนื่องจากมีขนาดเล็กในการศึกษานี้จึงวัดค่า  $Y_i$  ของกลุ่มโพรโทพลาสต์ และจำเป็นต้องทราบความหนาแน่นเพื่อปรับเทียบหาฟลักซ์สุทธิต่อหนึ่งโพรโทพลาสต์ต่อไป การศึกษานี้เลือกใช้สารรังสีที่เป็นไอออนของฟอสเฟต ( $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ ) เนื่องจากเป็นไอออนที่โพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ต้องการเป็นอาหาร

### บทที่ 3

#### วิธีการวิจัย

ในการวิจัยเพื่อศึกษาการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้า กระแสสลับได้แบ่งวิธีดำเนินการออกเป็นขั้นตอนสำคัญ ๆ ได้ 6 ขั้นตอนดังนี้

ตอนที่ 1 หาสารละลายเอนไซม์ผสมสำหรับแยกโพรโทพลาสต์ออกจากแผ่นใบ

ตอนที่ 2 หาความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลที่เหมาะสม สำหรับแขวนลอยโพรโทพลาสต์

ตอนที่ 3 ศึกษาสเปกตรัมไดอิเล็กทริกฟอเรติกของโพรโทพลาสต์ภายใต้เงื่อนไข สนามไฟฟ้า และสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย

ตอนที่ 4 ศึกษาการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้า

ตอนที่ 5 ประมวลค่าคงที่ของการยืดหยุ่น (K) และค่ายังมอดูลัส (Y) โดยอาศัย ทฤษฎีการเปลี่ยนรูปของเซลล์ทรงกลมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว

ตอนที่ 6 ศึกษาผลของสนามไฟฟ้าต่อการดูดซึมฟอสเฟตของโพรโทพลาสต์ โดยวิธีไอโซโทปรังสี P-32

ทุกขั้นตอนจะมีวัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ ดังต่อไปนี้

#### 3.1 วัสดุ

3.1.1 วัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.)

-กล้วยไม้สกุลหวายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

-อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงต้นพืช ใช้อาหารแข็งสูตร VW (Vacin and Went , 1949 ภาคผนวก 1 )

3.1.2 วัสดุสำหรับแยกโพรโทพลาสต์และแขวนลอยโพรโทพลาสต์

-เอนไซม์ Cellulase Onozuka-R10 ( Yakult Honsha Co.ltd. )

-เอนไซม์ Driselase ( Kyowa Hakko Kogyo Co.ltd.)

-เอนไซม์ Marcerozyme-R10 ( Yakult Honsha Co.ltd.)

-แมนนิทอล (D-Mannitol ; Fluka Biochemika)

-สารละลายเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

### 3.1.3 วัสดุสำหรับทดสอบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์

-Fluorescein diacetate ; FDA (Sigma Chemical Co.ltd.) ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

-Calcofluor white ; CFW (Sigma Chemical Co.ltd.) ทดสอบการมีผนังเซลล์

-อะซีโตน (บริษัทวิทยาศาสตร์ จำกัด)

### 3.1.4 วัสดุสำหรับศึกษาการดูดซึมอาหารของโพรโทพลาสต์

-สารละลายเกลือรังสีออร์โทฟอสเฟตในรูปของ  $\text{NH}_4\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$  (ผลิตโดยสำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ บางเขน กรุงเทพฯ)

-แผ่นกรองชนิด Glass Microfibre Filter เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 mm ขนาดรู 1.2  $\mu\text{m}$  (Whatman GF/C)

## 3.2 อุปกรณ์

### 3.2.1 อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้

-ค้อนไม้โครเวฟ (Sharp)

-ตู้ Laminar flow (รุ่น HS-124) สำหรับย้ายต้นกล้าของกล้วยไม้ลงอาหารใหม่

-ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์

-หม้อนึ่งอัดไอ (รุ่น MAC-60)

-จานเพาะเชื้อ (Petri dish) สำหรับแยกต้นกล้า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.8 cm

-เครื่องมือวัดความเข้มแสง (Lux Hi Tester รุ่น 3421)

-มีดผ่าตัดเบอร์ 4

-ปากคีบปลายแหลม (Forcep)

### 3.2.2 อุปกรณ์สำหรับแยกโพรโทพลาสต์ และเตรียมโพรโทพลาสต์ก่อนศึกษาด้วยไฟฟ้า

-หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml

-หลอดดูดสาร (Pasteur pipette) พร้อมจุกยาง

-ตะแกรงกรองชนิดไนลอน (Nylon mesh) ขนาดรู 141  $\mu\text{m}$  เส้นผ่าศูนย์กลาง

ของตะแกรงเป็น 1.5 cm

- อุปกรณ์นับเซลล์ ได้แก่ เครื่องนับเซลล์ (Hand tally counter)
- สไลด์สำหรับนับเซลล์ (Haemocytometer slide) พร้อมแผ่นปิดสไลด์
- จานหลุม (Well plate) ชนิด 24 หลุม เส้นผ่าศูนย์กลางหลุม 1.5 cm ลึก 2 cm สำหรับบรรจุเซลล์ขณะศึกษาภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ
- จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm
- เครื่องเขย่า (Shaker ; Bench-Top Orbito รุ่น 012116)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge ; IEC รุ่น HN-SII)
- เครื่องกวนแบบให้ความร้อน (Hot plate with stirrer ; Heidolph รุ่น MR3001)
- เครื่องชั่งสารระบบดิจิทัลแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler รุ่น PJ400)
- เครื่องวัดค่าสภาพนำไฟฟ้า (Teyracon 325 รุ่น LF318)
- เครื่องมือปรับ pH (Horiba รุ่น F-13)
- กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ (Olympus รุ่น CHA) กำลังขยายสูงสุด 100 เท่า สำหรับนับความหนาแน่นเซลล์

### 3.2.3 อุปกรณ์สำหรับศึกษาด้วยไฟฟ้ากระแสสลับ

- กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Olympus รุ่น LH50A) กำลังขยายสูงสุดของเครื่อง 600 เท่า สำหรับสังเกตพฤติกรรมของเซลล์ขณะเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า
- สายโคแอกเซียล (รุ่น RQ-58A/V) หัวต่อแบบ M-BNC
- เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ (Standford Research System รุ่น DS340) ซึ่งมีช่วงความถี่ระหว่าง 1 Hz ถึง 15 MHz ความต่างศักย์สูงสุด 10 V
- ลวดชนิดนิเกิลอัลลอยด์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125  $\mu\text{m}$  (ค่าความต้านทานเชิงผิว 1,000 โอห์มต่อนิ้วฟุต (บริษัท California Fine Wire))
- อุปกรณ์สำหรับปรับเลื่อนอย่างละเอียด (Micromanipulator ; Narishige รุ่น MO-202 และ MO-203)
- เครื่องออสซิลโลสโคปสำหรับแสดงคลื่นสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ (Hameg รุ่น HM303)
- เครื่องพิมพ์ภาพ (Color video printer ; Sony รุ่น UP-1200AEP)

-โทรทัศน์สีขนาด 29 นิ้ว (Sony รุ่น KV-K25MZ1) พร้อมเครื่องเล่นวีดีโอ (Sony รุ่น SLV-K872)

-ชุดอุปกรณ์สำหรับดูดและปล่อยเซลล์ประกอบด้วยกระบอกฉีดขนาด 1 ml สายยาง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 mm ยาวประมาณ 3 ฟุต หลอดแก้วไมโครแคพิลลารี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 mm (Vitrex รุ่น 160231) ดึงปลายให้แหลมและตัดให้งอได้จากด้วยความร้อน เส้นผ่าศูนย์กลางปลายหลอดประมาณ 100  $\mu$ m ชุดปรับเลื่อน (Narishige รุ่น M-152) และเครื่องฝนหลอดแก้วแคพิลลารี (Narishige รุ่น EG-4) ภาพประกอบ 9

-ม้วนวีดีโอสำหรับบันทึกภาพ (Sony รุ่น E-180DXE) ความยาว 180 นาที

-ชุดอุปกรณ์ดึงลวดพร้อมอุปกรณ์ปรับกระแส และ แรงดันไฟฟ้าแบบกระแสสลับ (Variable ac. voltage)

### 3.2.4 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะยึกของเซลล์

-นาฬิกาจับเวลา (Casio รุ่น HS-5)

-เครื่องเล่นวีดีโอ (Sony รุ่น SLV-KH7)

-จอภาพ (Monitor ; Sony รุ่น PVM-1453MD) ขนาดจอ 14 นิ้ว

-สเกลวัดระยะซึ่งทำด้วยพลาสติกใสขนาด 20x20 cm เพื่อใช้ทาบบนจอภาพ

### 3.2.5 อุปกรณ์สำหรับประมวลผล

-ไมโครคอมพิวเตอร์ (Laser รุ่น 16X Max)

-โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel, Microsoft Word และ Microsoft PowerPoint

### 3.2.6 อุปกรณ์สำหรับศึกษาการดูดกลืนสารรังสีของโพโรโทพลาสติก

-เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Gast รุ่น 0211)

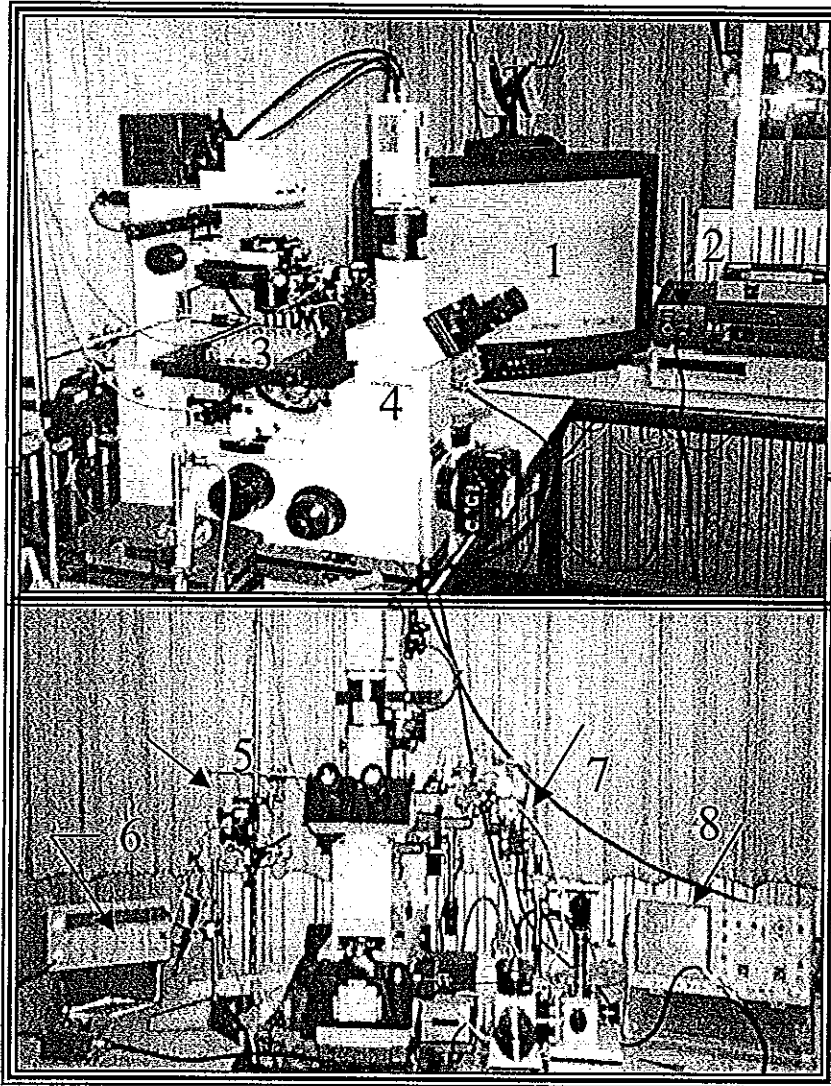
-เครื่องกรอง (Polycarbonate filter) ชนิด 3 หัวกรอง (Satorius รุ่น SM16510)

-เครื่องวัดรังสี (Geiger muller รุ่น 575 บริษัท Nucleus)

-หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml จำนวน 10 หลอด

-เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge รุ่น M 0009861 บริษัท Denver Instrument)

-อุปกรณ์ป้องกันสารรังสี (Nalgene รุ่น 6807-0024)



ภาพประกอบ 9 ชุดอุปกรณ์เหนี่ยวนำโพโรโทพลาสติก

1 โทรทัศน์สี SONY

2 เครื่องเล่นวีดีโอ SONY

3 จานหมุนชนิด 24 หลุม

4 กัดึงจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

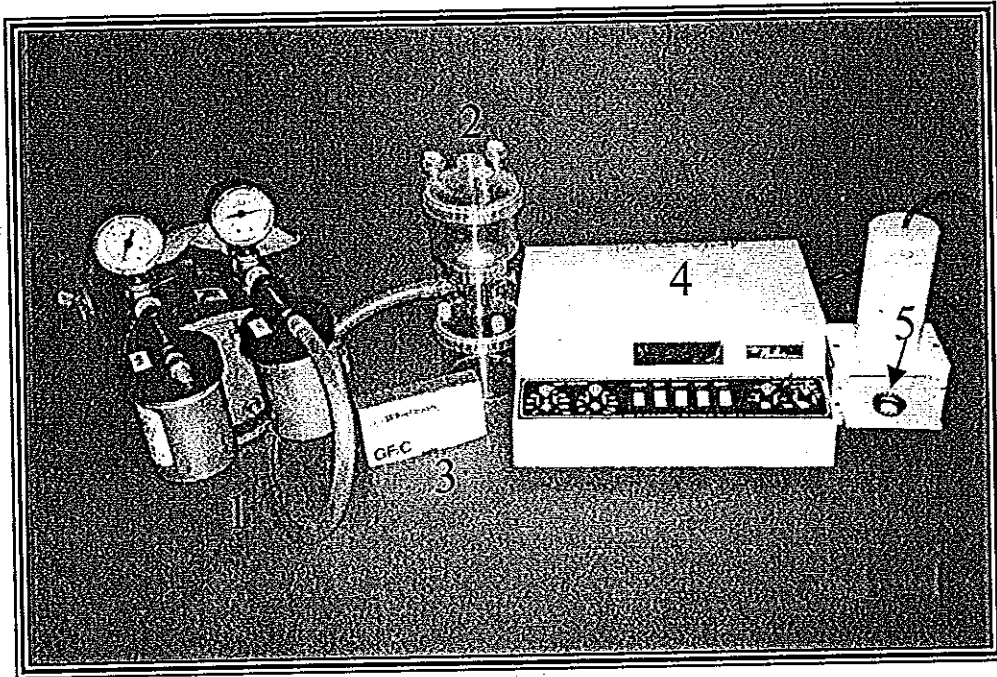
5 ชุดอุปกรณ์ดูค-ปล่อยเซลล์

6 เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ มีช่วงความถี่

1 Hz-15 MHz ความต่างศักย์สูงสุด 10 V

7 อุปกรณ์ปรับเลื่อนขั้วไฟฟ้า

8 เครื่องออกซซิลโลสโคปแสดงคลื่นสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ



ภาพประกอบ 10 ชุดอุปกรณ์นับรังสี

1 เครื่องปั๊มสุญญากาศ

2 เครื่องกรอง Polycarbonate filter ชนิด 3 หัวกรอง

3 กระดาษกรองชนิด Glass microfilter

4 เครื่องวัดรังสี Geiger Muller

5 ตัวอย่างโพรโทพลาสติกที่จะนับรังสี วางบนฝาขวดน้ำอัดลม

ห่างจากหัววัด 2 cm

- ถุงมือยาง (เมดไลน์ รุ่น 9801159)
- เข็มฉีดยา (Disposable needle) ขนาด 0.55x32 mm (บริษัท Nippon Shoji Kaisha)
- กระบอกฉีดยา (Disposable syringe) ปริมาตร 1 ml (บริษัท Yamaguchi Medical Instrument)
- ออดิปีเปต ขนาด 100-1000  $\mu$ l และ ขนาด 20-200  $\mu$ l (บริษัท Nichiryu) พร้อมหลอดดูดสาร (tip) ขนาดเดียวกัน
- ปากคีบพลาสติกสำหรับคีบกระดาษกรองที่เป็อนสารรังสี

### 3.3 วิธีดำเนินการ

#### 3.3.1 หาสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับแยกโพรโทพลาสต์

##### 1) วิธีการเพาะเลี้ยงพืชตัวอย่างโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื่องจากการทดลองนี้ใช้พืชตัวอย่างคือกล้วยไม้สกุลหวาย ที่เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้อาหารแข็งสูตร VW ดังนั้นเมื่อพืชตัวอย่างมีการเจริญเติบโตโดยการแตกกอใหม่เต็มภาชนะหรือสังเกตเห็นว่ารูอาหารเริ่มมีรอยแตกสีน้ำตาลเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล อาหารอาจเริ่มเหลว เนื่องจาก pH ต่ำลง หรืออาหารหมด เมื่อเกิดเหตุการณ์เหล่านี้ จำเป็นต้องมีการย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่เพื่อขยายพันธุ์พืชให้เพียงพอต่อการศึกษา โดยพืชตัวอย่างจะเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25-28°C ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์

##### 2) วิธีการเตรียมเอนไซม์

ประศาสตร์ (2538) เสนอว่าเนื่องจากเซลล์พืชทุกชนิดนอกจากจะมีเยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังมีผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่งห่อหุ้มเซลล์อยู่ซึ่งประกอบด้วยสารพวก cellulose และ hemicellulose เซลล์พืชแต่ละเซลล์ที่อยู่ติดกันจะเชื่อมด้วยชั้น มิดเดิลลามลลา (middle lamella) ซึ่งประกอบด้วยสารพวกเพคติน (pectin) ฉะนั้นในการย่อยเซลล์เพื่อแยกโพรโทพลาสต์ออกมา จึงต้องมีเอนไซม์ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกสำหรับย่อยมิดเดิลลามลลา คือ เอนไซม์เพคตินเอส (Pectinase) และกลุ่มที่ใช้ย่อยผนังเซลล์คือ Cellulase และ Hemicellulase เนื้อเยื่อพืชเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์เพคตินเอส เซลล์จะหลุดแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่ยังคงมีผนังเซลล์ห่อหุ้มอยู่ จึงทำให้รูปร่างของเซลล์ยังเหมือนเดิมแต่หลังจากการย่อยด้วย Cellulase แล้ว เซลล์จะเหลือเพียงแต่เยื่อหุ้มเซลล์ห่อหุ้มอยู่เท่านั้น รูปร่างของเซลล์จะ

กลมเหมือนกันหมด และสำหรับใบกล้วยไม้ที่ผ่านการย่อยผนังเซลล์ออกแล้ว นอกจากจะ  
ได้โพโทพลาสต์แล้วยังมีส่วนที่เป็นผลึกแข็งซึ่งอาจจะทึบแสงโพโทพลาสต์ให้แตกได้ จึง  
จำเป็นต้องทำการแยกเฉพาะโพโทพลาสต์ออกจากเศษเซลล์เหล่านี้ด้วยวิธีการแยกชั้นของ  
เซลล์โพโทพลาสต์จากเศษเซลล์โดยวิธีการ Sucrose density gradient ซึ่งจะกล่าวใน  
ขั้นตอนการทดลองต่อไป

เอนไซม์ที่เลือกศึกษามี 3 ชนิด คือ Cellulase Driselase และ Marcerozyme  
โดย Cellulase และ Driselase จัดอยู่ในกลุ่มที่ใช้สำหรับย่อยผนังเซลล์ ส่วนเอนไซม์  
Marcerozyme จัดอยู่ในกลุ่มที่ใช้สำหรับย่อยมิดเดิลลามเมลลา ซึ่งจะทดลองหาอัตราส่วนของ  
เอนไซม์ผสมที่เหมาะสมในการแยกโพโทพลาสต์ ออกจากใบกล้วยไม้สกุลหวาย เลือก  
ศึกษา 4 สูตรโดยให้เอนไซม์ละลายในน้ำตาลแมนนิทอล  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ซึ่งมีความเข้มข้น  
มากกว่าสารละลายภายในเซลล์เนื่องจากใบจะช่วยให้ช่วยทำให้การย่อยผนังเซลล์ง่ายขึ้น และ  
เลือกใช้น้ำตาลแมนนิทอลเนื่องจากเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ และนิยมใช้  
แมนนิทอลในการแยกโพโทพลาสต์จากแผ่นใบ (คำบุญ, 2537) ต่อมาในขั้นตอนการล้าง  
โพโทพลาสต์เพื่อนำไปแขวนลอยในสารละลายแมนนิทอลอีกครั้ง จะค่อยๆ ลดความเข้มข้น  
ลงเป็น  $0.6 \text{ kmol.m}^{-3}$  และ  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  ตามลำดับ เพื่อให้โพโทพลาสต์ค่อยๆ ปรับ  
สภาพให้เต่งขึ้นอีกครั้ง

สารละลายเอนไซม์ผสมที่เลือกศึกษาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กล่าวคือ กลุ่มแรก  
เป็นเอนไซม์ผสมที่ต้องการศึกษาผลของ Driselase ได้แก่ เอนไซม์สูตรที่ 1 และสูตรที่ 2  
กลุ่มที่สองต้องการศึกษาผลของเอนไซม์ Cellulase ได้แก่ เอนไซม์สูตรที่ 3 ส่วนสูตรที่ 4  
ต้องการยืนยันผลว่าถ้ามีเอนไซม์ Cellulase มีความเข้มข้นมากแต่ไม่มี Driselase จะย่อย  
เซลล์ได้ไม่ดี ซึ่งทั้ง 4 สูตรมีส่วนประกอบของเอนไซม์แต่ละชนิดดังนี้

#### สูตรที่ 1 ประกอบด้วย

1. Cellulase 1%
2. Driselase 1%
3. Marcerozyme 0.5%

#### สูตรที่ 2 ประกอบด้วย

1. Cellulase 1%
2. Macerozyme 0.5%

### สูตรที่ 3 ประกอบด้วย

1. Cellulase 2%
2. Driselase 1%
3. Marcerozyme 0.5%

### สูตรที่ 4 ประกอบด้วย

1. Cellulase 2%
2. Marcerozyme 0.5%

### 3) ตัวอย่างการเตรียมเอนไซม์สูตรที่ 3

1 Cellulase 2 % คำนวณเทียบโดยใช้สมการ  $M_1V_1 = M_2V_2$  ต้องการเตรียม  
ในแมนนิทอล  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ปริมาตร 20 ml

$$100V_1 = 2 \times 20$$

$$V_1 = 0.4 \text{ กรัม}$$

$M_1$  ให้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์ =  $100 \text{ kmol.m}^{-3}$

$M_2$  ให้เป็นความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ต้องการ 2 % นั่นคือ =  $2 \text{ kmol.m}^{-3}$

$V_2$  ให้เป็นปริมาตรของสารละลายที่แมนนิทอล  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ในที่นี้เตรียม 20 ml

$V_1$  ให้เป็นปริมาตรสารที่ต้องนำมาละลายให้ได้ความเข้มข้น 2 % ซึ่งหน่วยเป็นกรัม  
เนื่องจากเอนไซม์เป็นของแข็งซึ่ง 1 กรัม เทียบได้กับ 1 ml นั้นเอง

2 Marcerozyme 0.5 % และ Driselase 1 % วิธีการคำนวณเหมือนกับ  
Cellulase 2 %

### 3 นำเอนไซม์ทั้งสามชนิดที่ชั่งได้จากการคำนวณ ละลายในสารละลาย

แมนนิทอล  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ปริมาตร 20 ml

4 เมื่อเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดละลายหมด นำไปปรับ pH โดยใช้สารละลายปรับ  
กรดคือ HCl  $0.1 \text{ kmol.m}^{-3}$  และ สารละลายปรับเบสคือ NaOH  $0.1 \text{ kmol.m}^{-3}$  ให้ได้ค่า pH  
เป็น 5.7 เมื่อได้ค่า pH ตามที่ต้องการแล้วนำไปหมუნเหวี่ยงด้วยเครื่องหมუნเหวี่ยง ด้วย  
ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5 ดูดสารละลายเอนไซม์ผสมเฉพาะส่วนที่ใส ใส่ขวดพลาสติก สำหรับ  
เก็บสารแล้วนำไปเก็บไว้ในช่องแข็งของผู้เย็นเพื่อคงสภาพความไวต่อปฏิกิริยา (activity)  
ของเอนไซม์ไว้ วิธีการเตรียมเอนไซม์สูตรอื่นๆ ก็ทำนองเดียวกัน

#### 4) วิธีการหาสารละลายเอนไซม์ผสมสำหรับแยกโพรโทพลาสต์จากแผ่นใบ

1 คัดเลือกใบกล้วยไม้สกุลหวาย ที่เจริญเต็มที่ ขนาดของใบยาว 3-4 cm ตัดปลายยอดและโคนใบออกประมาณ 0.5 cm แช่ใบทิ้งไว้ในน้ำตาลแมนนิทอล  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  เป็นเวลาประมาณ 15 นาที เพื่อให้เซลล์เหี่ยวก่อน เนื่องจากสารละลายภายนอกมีแรงดันออสโมติกสูงกว่าภายในเซลล์จึงเกิดการสูญเสียน้ำ ซึ่งจะช่วยให้การแยกโพรโทพลาสต์ออกจากแผ่นใบง่ายขึ้น

2 หั่นใบเป็นชิ้นเล็กๆ ตามขวางแช่ในเอนไซม์ทั้ง 4 สูตร ด้วยจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm โดยแต่ละสูตรต้องมีอัตราส่วนของน้ำหนักใบต่อปริมาตรสารละลายเอนไซม์ผสมเป็น 1:10 ในที่นี้ใช้ใบ 0.4 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ผสม 4 ml (ภาพประกอบ 11)

3 บ่มไว้ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $28^{\circ}\text{C}$  สังเกตดูทุกชั่วโมง โดยสุ่มเซลล์จากแต่ละชุด มาทดสอบว่ายังมีผนังเซลล์หรือไม่ ด้วยเทคนิคการย้อมสีเซลล์ด้วยสารเรืองแสง CFW (ภาคผนวก 2) พบว่าที่ 3 ชั่วโมง เอนไซม์ทุกสูตรจำนวนโพรโทพลาสต์เริ่มแยกได้มากกว่าเศษเซลล์ และสามารถเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ของเอนไซม์แต่ละสูตรได้

4 เมื่อครบ 3 ชั่วโมง นำโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ทั้ง 4 ชุด ซึ่งยังปะปนอยู่กับพวกเศษเซลล์ มากรองเอาเศษเซลล์ที่มีขนาดใหญ่บางส่วน ออกจากโพรโทพลาสต์ ด้วยตะแกรงกรองไนลอนที่มีขนาดรู  $141 \mu\text{m}$  ใส่จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm แต่อย่างไรก็ดียังไม่สามารถกรองเอาเศษเซลล์ได้หมด จึงจำเป็นต้องนำไปทำการแยกชั้นโพรโทพลาสต์จากเศษเซลล์ด้วยวิธี Sucrose density gradient

#### 5) วิธีการ Sucrose density gradient

เป็นวิธีการแยกสารประกอบอินทรีย์ ที่รวมกันในสารละลาย อาศัยการตกตะกอนผ่านชั้นของสารละลายที่มีความหนาแน่นต่างกัน โมเลกุลที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าก็ไม่สามารถตกตะกอนผ่านชั้นของสารละลายที่มีความหนาแน่นมากกว่าได้ จึงเกิดการแยกชั้นกันของโมเลกุลโดยอาศัยหลักการหมุนเหวี่ยง ซึ่งขึ้นกับความเร็วและเวลาในการหมุนเหวี่ยง (Hoppe, *et al.*, 1983) ในการทดลองนี้เลือกใช้สารละลายน้ำตาลซูโครส  $0.6 \text{ kmol.m}^{-3}$  ความหนาแน่นเป็น  $1.064 \times 10^3 \pm 0.002 \text{ kg.m}^{-3}$  สารละลายที่ใช้สำหรับแยกของโพรโทพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ ซึ่งแขวนลอยในสารละลายเอนไซม์ผสมในแมนนิทอล

$0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ความหนาแน่นเป็น  $1.045 \times 10^3 \pm 0.001 \text{ kg.m}^{-3}$  (ภาคผนวก 2) โดยให้สารละลายที่มีเซลล์โพรโทพลาสต์ และเศษเซลล์ปะปนอยู่วางบนสารละลายซูโครส ที่มีปริมาตรเท่ากัน โพรโทพลาสต์ที่ปราศจากผนังเซลล์จะมีน้ำหนักน้อยกว่าเศษเซลล์ที่ถูกย่อยออกมาเปรียบเสมือนโมเลกุลของสารประกอบสองชนิดที่มีความหนาแน่นต่างกัน ดังนั้นโมเลกุลใดที่มีความหนาแน่นมากกว่าสารละลายซูโครส จะสามารถตกตะกอนผ่านชั้นของสารละลายซูโครสได้ ส่วนโมเลกุลที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าจะไม่สามารถผ่านชั้นของซูโครสได้ เซลล์จะตกลงมาอยู่แค่อรอยต่อของสารละลายทั้งสองจึงเกิดเป็นวงแหวนระหว่างรอยต่อของสารละลาย ส่วนของโมเลกุลที่เป็นวงแหวนนั้นคือโพรโทพลาสต์นั่นเอง ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1 นำสารละลายซูโครส  $0.6 \text{ kmol.m}^{-3}$  ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml ปรับปริมาตรเป็น 4 ml เพื่อให้เท่ากับปริมาตรของโพรโทพลาสต์ที่ปะปนอยู่กับเศษเซลล์

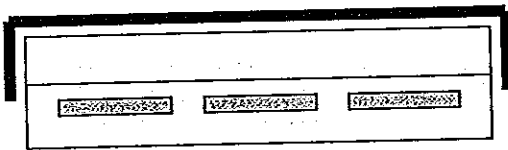
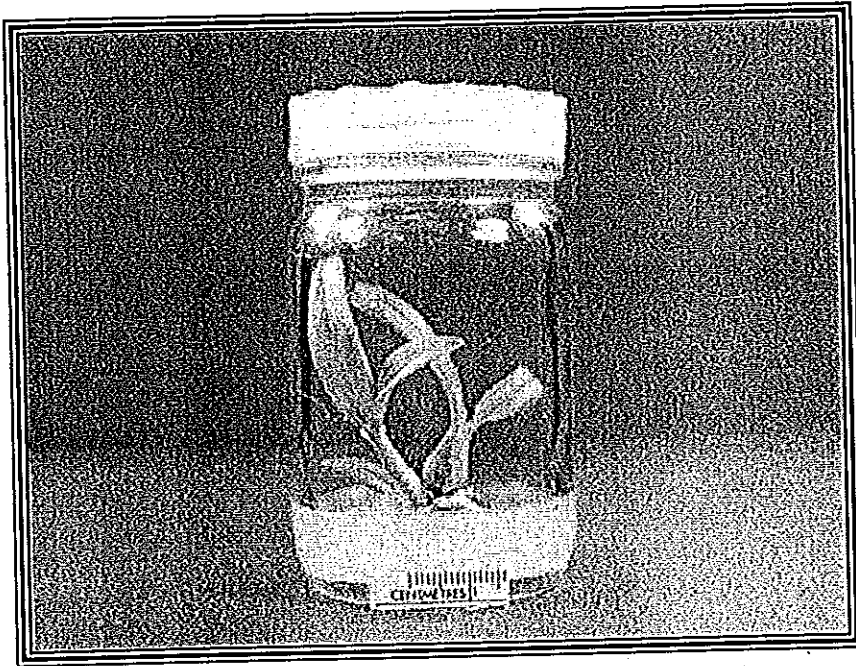
2 นำโพรโทพลาสต์ที่มีเศษเซลล์ปะปนแต่ผ่านการกรองแล้วครึ่งหนึ่ง โดยค่อยๆ ดูดด้วยหลอดดูดสาร ใส่ลงบนสารละลายน้ำตาลซูโครส  $0.6 \text{ kmol.m}^{-3}$  จะสังเกตเห็นว่าสารละลายที่มีโพรโทพลาสต์แขวนลอยแยกชั้นอยู่ด้านบน ไม่รวมกับสารละลายน้ำตาลซูโครสเนื่องจากความหนาแน่นสารต่างกันดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

3 นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที พบว่ามีวงแหวนเกิดขึ้นที่ชั้นรอยต่อระหว่างสารละลายซูโครส และสารละลายแมนนิทอล กล่าวคือ อยู่เหนือสเกล 4 ml และบางส่วนตกตะกอนอยู่ก้นหลอดเซนตริฟิวจ์

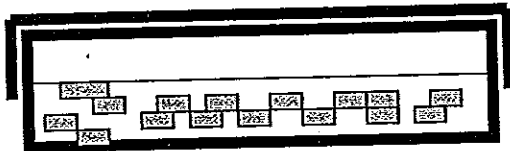
4 ดูดเอาโพรโทพลาสต์ส่วนที่เป็นวงแหวนมาล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  แล้วปรับปริมาตรเป็น 4 ml

5 ทำการนับความหนาแน่นโพรโทพลาสต์ (จุดิพร, 2541)

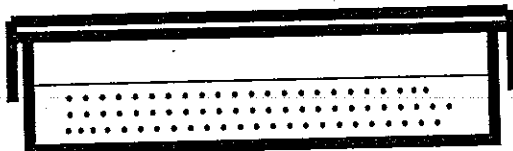
6 บันทึกความหนาแน่นโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากเอนไซม์ทั้ง 4 สูตร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ของเอนไซม์แต่ละสูตร



-หั่นปลายยอดและโคนใบออก  
ด้านละ 0.5 cm แช่ในสารละลาย  
แมนนิทอล  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$   
ประมาณ 15 นาที ให้ใบเหี่ยว

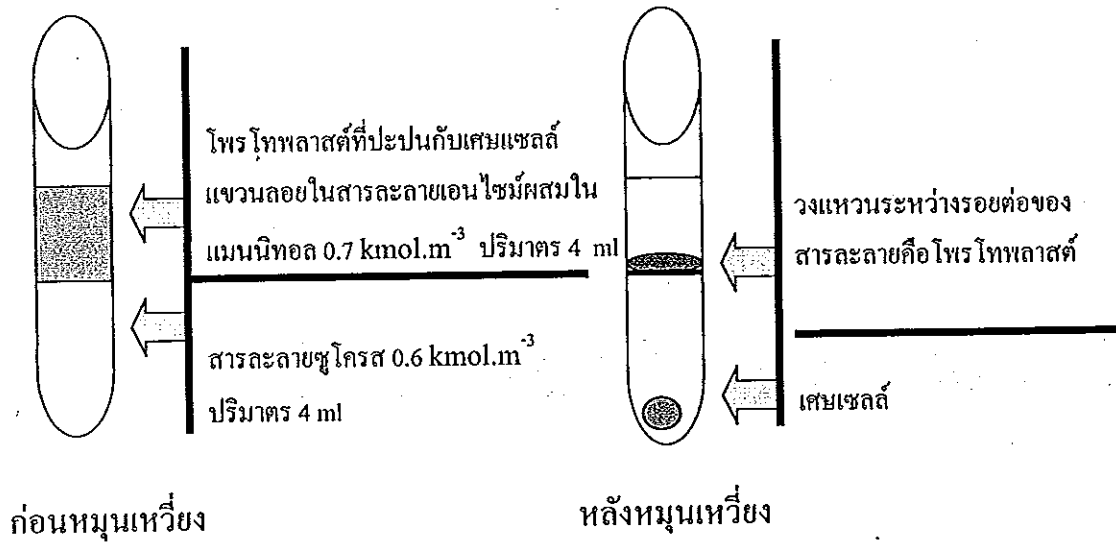


-หั่นใบเป็นชิ้นเล็กๆแล้ว  
แช่ในสารละลายเอนไซม์



-โปรโตพลาสต์ที่แยกได้

ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสต์ *Dendrobium* sp.  
ออกจากแผ่นใบ



ภาพประกอบ 12 การแยกชั้นของโพรโทพลาสต์จากการทำ Sucrose density gradient

#### 6) วิธีการหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยผนังเซลล์

เมื่อได้สูตรเอนไซม์ที่เหมาะสม ที่สามารถแยกโพรโทพลาสต์ออกมาได้มากที่สุดตามการทดลองข้างต้น เลือกเอนไซม์สูตรดังกล่าวมาใช้แยกโพรโทพลาสต์ โดยเปลี่ยนเวลาในการย่อยผนังเซลล์ เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการแยกมีวิธีการดังนี้

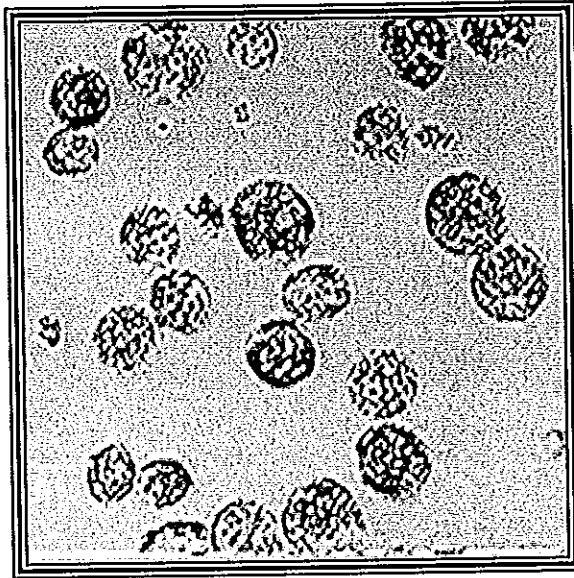
1. คัดเลือกใบกล้วยไม้สกุลหวาย ตามขั้นตอนการหาสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสม ข้างต้น ชั่งใบ 0.4 กรัม แช่ทิ้งไว้ในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอล  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ปริมาตร 4 ml เป็นเวลาประมาณ 15 นาที เพื่อให้เซลล์เหี่ยวก่อน

2. หั่นใบเป็นชิ้นเล็กๆ ตามขวางนำไปแช่ในเอนไซม์สูตรที่พบว่าเหมาะสม

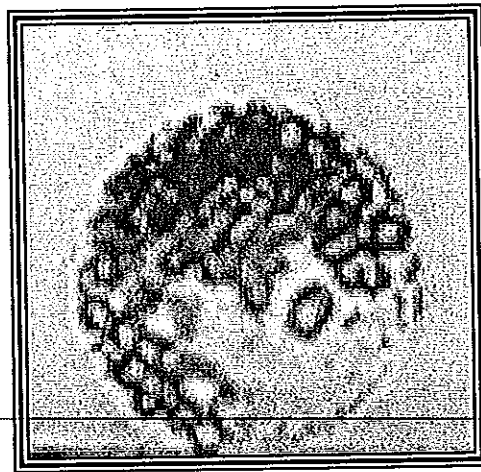
จากการทดลองข้างต้น ด้วยจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm แบ่งเป็น 3 ชุดสำหรับติดตามนับความหนาแน่นเซลล์ ที่เวลา 3 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ เนื่องจากพบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง เซลล์สามารถแยกออกมาได้มากกว่าเศษเซลล์

3. บ่มไว้ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $28^{\circ}\text{C}$  นำเซลล์มาล้างด้วยวิธีการ Sucrose density gradient และนับความหนาแน่นเซลล์ทุกๆ 3 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง บันทึกความหนาแน่นโพรโทพลาสต์ทุกชุดที่เวลาในการย่อยผนังเซลล์ต่างๆ กัน

(a) กำลังขยาย 100 เท่า



(b) กำลังขยาย 200 เท่า



ภาพประกอบ 13 โพรโทพลาสต์ที่ผ่านการย่อยเอาผนังเซลล์ออกแล้ว

(a) โพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ที่ผ่านการย่อยเอา

ผนังเซลล์ออกแล้วแขวนลอยในสารละลายแมนนิทอล

$0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  ความหนาแน่นโพรโทพลาสต์  $5.15 \times 10^4$  per ml

(b) โพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง

$50 \mu\text{m}$

### 3.3.2 หาความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลที่เหมาะสมสำหรับแวน-ลอยโพรโทพลาสต์

1 เตรียมโพรโทพลาสต์ตามขั้นตอนข้างต้น โดยเลือกใช้เอนไซม์สูตรที่เหมาะสมที่สุดที่หาได้ นำโพรโทพลาสต์ที่ได้แวนลอยในแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  ซึ่งพบว่าสามารถแวนลอยอยู่ได้โดยไม่ทำให้โพรโทพลาสต์เปลี่ยนรูป แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการแวนลอยโพรโทพลาสต์

2 เตรียมสารละลายน้ำตาลแมนนิทอล  $0.3 \text{ kmol.m}^{-3}$ ,  $0.4 \text{ kmol.m}^{-3}$ ,  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$ ,  $0.6 \text{ kmol.m}^{-3}$  และ  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ใส่ลงในจานหลุมชนิด 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ  $500 \mu\text{l}$  จำนวน 5 หลุม นำโพรโทพลาสต์ที่เจือจางมากๆ ใส่ในจานหลุมๆ ละ  $500 \mu\text{l}$

3 อีกจำนวน 3 หลุมเลือกโพรโทพลาสต์จากหลุมในข้อที่ 2 ที่มีขนาดโพรโทพลาสต์ใกล้เคียงกันประมาณ  $50 \mu\text{m}$  ย้ายมายังหลุมที่มีความเข้มข้นของสารละลายแมนนิทอลต่างๆ กัน ประมาณความเข้มข้นละ 50 โพรโทพลาสต์ ย้ายโพรโทพลาสต์ด้วยชุดเครื่องมือสำหรับดูด-ปล่อยเซลล์ นับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่ไม่เปลี่ยนรูปไปหลังจากวางทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบความหนาแน่นโพรโทพลาสต์ของแต่ละชุดในช่วงเวลาต่างๆ กัน

### 3.3.3 ศึกษาสเปกตรัมไดอิเล็กโตรฟอเรติกของโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์ ภายใต้เงื่อนไขความเข้มสนามไฟฟ้า และสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย

#### 1) การศึกษาสเปกตรัมไดอิเล็กโตรฟอเรติกของโพรโทพลาสต์

ในการทดลองนี้ศึกษาสเปกตรัมไดอิเล็กโตรฟอเรติกของโพรโทพลาสต์

ภายใต้เงื่อนไขของความเข้มสนามไฟฟ้า และสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายภายนอก ( $\sigma_s$ ) โดยเลือกศึกษาตั้งแต่ที่ความเข้มสนามไฟฟ้าต่ำไปสูงเริ่มที่  $17 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $30 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  ตามลำดับ และ เลือกศึกษาที่  $\sigma_s$  เป็น  $1 \text{ mS.m}^{-1}$ ,  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  และ  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  ตามลำดับ ซึ่งโดยปกติเซลล์ชีวภาพจะเกิดการโพลาริไซ์ได้ดี เมื่อแวนลอยในสารละลายภายนอกที่มีสภาพนำไฟฟ้าช่วง  $1-100 \text{ mS.m}^{-1}$  (Pohl, 1978) โดยให้ระยะห่างระหว่างขั้วไฟฟ้าคงที่  $250 \mu\text{m}$  ดังวิธีการต่อไปนี้

1 เตรียมโพรโทพลาสต์แวนลอยในสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  ที่ปรับสภาพนำไฟฟ้าด้วยสารละลาย KCl เป็น  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  (ภาคผนวก 3)

2 แบ่งโพรโทพลาสต์ใส่จานหลุมชนิด 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 500  $\mu\text{l}$  จำนวน 5 หลุม นำสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  สภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  ใส่จานหลุมเดียวกันจำนวน 12 หลุม สำหรับเหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์ที่ความเข้มสนามไฟฟ้าต่างกัน แต่ละความเข้มสนามทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 3 เซลล์

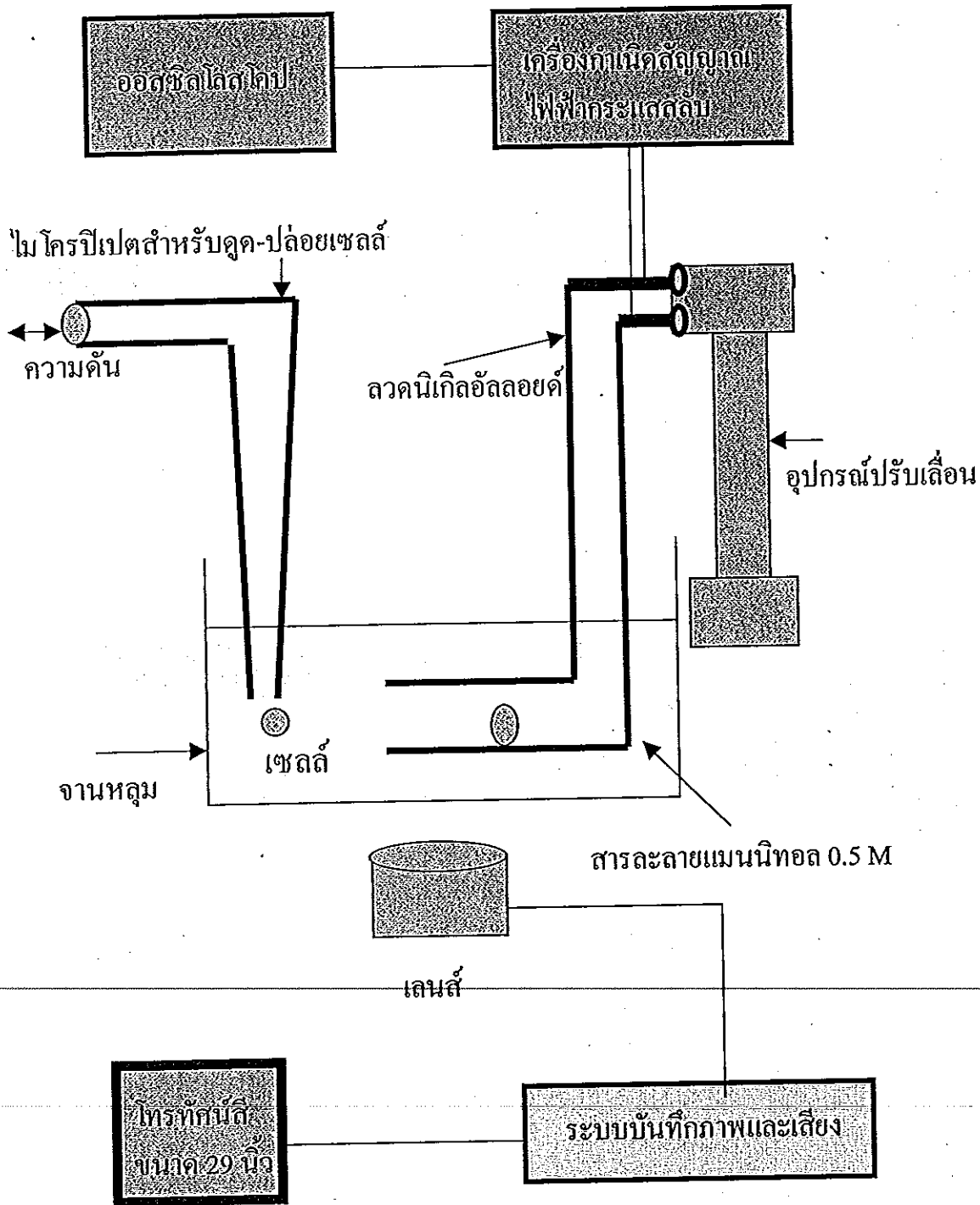
3 จัดอุปกรณ์ชุดเหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์ โดยให้ขั้วไฟฟ้าขนานกัน (ภาพประกอบ 14) เลือกโพรโทพลาสต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ  $50 \mu\text{m}$  มา 1 โพรโทพลาสต์ ด้วยอุปกรณ์สำหรับดูด-ปล่อยเซลล์ ย้ายโพรโทพลาสต์ใส่ในหลุมที่มีสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  สภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$

4 วางโพรโทพลาสต์ให้อยู่ใกล้เคียงจุดกึ่งกลางขั้วไฟฟ้าที่ตำแหน่ง  $z = 0$  และ  $y = 0$  มากที่สุดปรับระยะห่างระหว่างขั้วไฟฟ้าเป็น  $250 \mu\text{m}$  ให้ศักย์ไฟฟ้า  $3 \text{ V}$  ซึ่งมีความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  ความถี่เริ่มจากที่ความถี่สูงสุดของเครื่องมือ  $15 \text{ MHz}$  ลงมา จนถึงความถี่ที่โพรโทพลาสต์ไม่เคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วไฟฟ้า โดยทุกครั้งที่เปลี่ยนความถี่ต้องจัดโพรโทพลาสต์ให้อยู่ระหว่างขั้วไฟฟ้าใหม่ทุกครั้ง

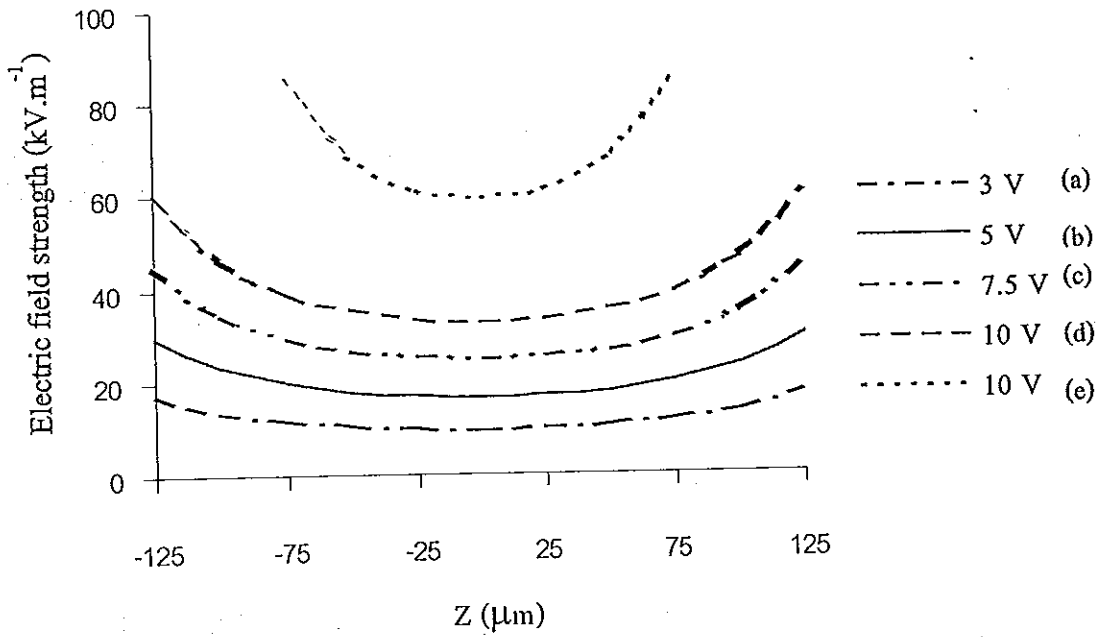
5 บันทึกภาพและการบรรยายลงม้วนวิดีโอและทำการทดลองตามข้อ 1- 4 แต่เปลี่ยนศักย์เป็น  $5 \text{ V}$ ,  $7.5 \text{ V}$  และ  $10 \text{ V}$  ซึ่งมีความเข้มสนามไฟฟ้า เป็น  $30 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  ตามลำดับ (ภาพประกอบ 15) จากนั้นเปลี่ยนสภาพนำไฟฟ้าเป็น  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  และ  $20 \text{ mS.m}^{-1}$

## 2) การศึกษาสเปกตรัมไดอิเล็กโทพอเรติกของกลุ่มโพรโทพลาสต์

จตุพร (2541) พบว่าเมื่อให้กลุ่มเซลล์แพลงก์ตอนแขวนลอยในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้าต่ำต่ำ ถูกเหนี่ยวนำด้วยในสนามไฟฟ้าแบบไม่สม่ำเสมอทำให้เกิดไดโพลขึ้นภายในเซลล์ และเซลล์ที่อยู่ใกล้กันจะส่งแรงดึงดูดกัน เกิดเป็นโซ่เซลล์ และ Pohl (1978) เสนอว่าความหนาแน่นเซลล์มีผลต่อสเปกตรัม DEP ดังนั้นการทดลองนี้จะศึกษาสเปกตรัม DEP ของกลุ่มโพรโทพลาสต์โดยผันแปรความถี่ของสัญญาณไฟฟ้าและเลือกศึกษาที่สภาพนำไฟฟ้าเหมือนการทดลองกับโพรโทพลาสต์ข้างต้น ปรับความหนาแน่นให้อยู่ในช่วง  $(2 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ per ml}$  เนื่องจากส่วนใหญ่ในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ความหนาแน่นจะอยู่ในช่วง  $10^4 - 10^5 \text{ per ml}$  (ประศาสตร์, 2538) และการทดลองนี้จะนำไปศึกษาการดูดซึมอาหารของโพรโทพลาสต์ในขั้นตอนต่อไปได้ ให้โพรโทพลาสต์เกาะขั้วไฟฟ้าโดยเปลี่ยน



ภาพประกอบ 14 แผนภาพอุปกรณ์ทดลองสำหรับศึกษาการยึดของไทรโทปัสดี *Dendrobium* sp.



ภาพประกอบ 15 ความเข้มสนามไฟฟ้าที่ตำแหน่งต่างๆ ระหว่างขั้วไฟฟ้าในแนวแกน z เมื่อศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วมีค่าต่างๆ กัน  
 (a), (b), (c), (d) มีระยะห่างระหว่างขั้ว 250 μm และ (e) มีระยะห่างระหว่างขั้ว 150 μm

แปลงความเข้มข้นไฟฟ้า 3 ค่า คือ  $17 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  เริ่มให้ความถี่จาก 15 MHz และลดความถี่ลงจนถึงความถี่ที่โพรโทพลาสต์ไม่เกาะขั้วไฟฟ้า

### 3.3.4 ศึกษาการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ

#### 1) การยึดโพรโทพลาสต์ กับขั้วไฟฟ้าภายใต้แรงโคอิเล็กโทรฟอเรติก

เตรียมโพรโทพลาสต์ตามข้อ 1-3 ของวิธีการ 3.3.3 เพื่อให้ได้โพรโทพลาสต์ และนำมาแขวนลอยในสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  ที่มีสภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  และ  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  วางโพรโทพลาสต์ให้อยู่ระหว่างขั้วไฟฟ้าแล้วให้สนามไฟฟ้าขนาด  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  ที่ความถี่ 1 MHz เมื่อโพรโทพลาสต์เคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้าจึงเปลี่ยนความเข้มข้นไฟฟ้าหรือความถี่ตามที่ต้องการศึกษา (ภาพประกอบ 16)

#### 2) ศึกษาผลของความเข้มข้นไฟฟ้า ความถี่และเวลาในสนามไฟฟ้าต่อการยึดของโพรโทพลาสต์

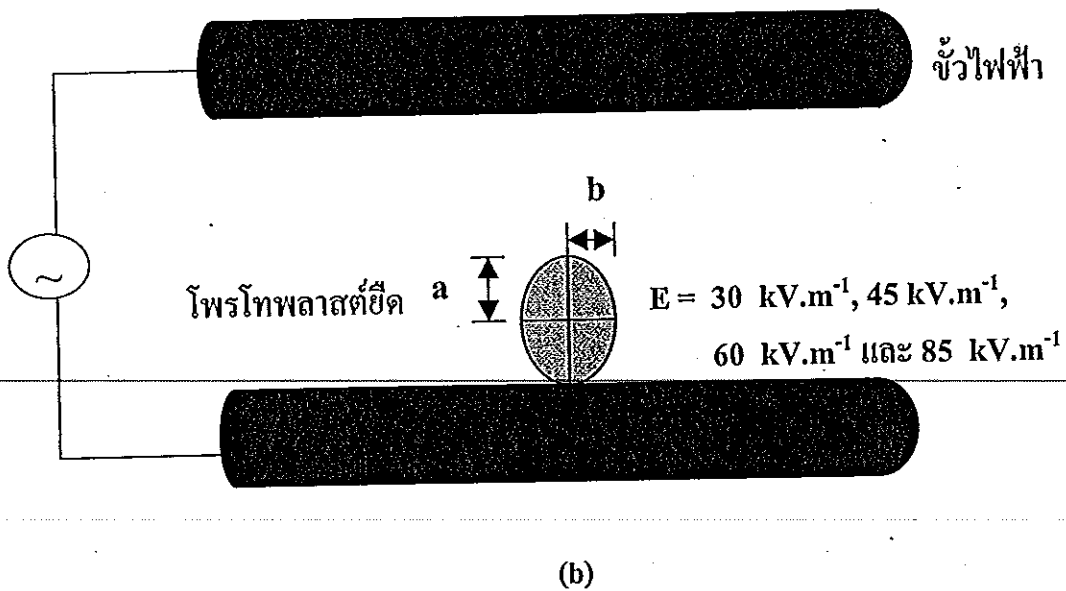
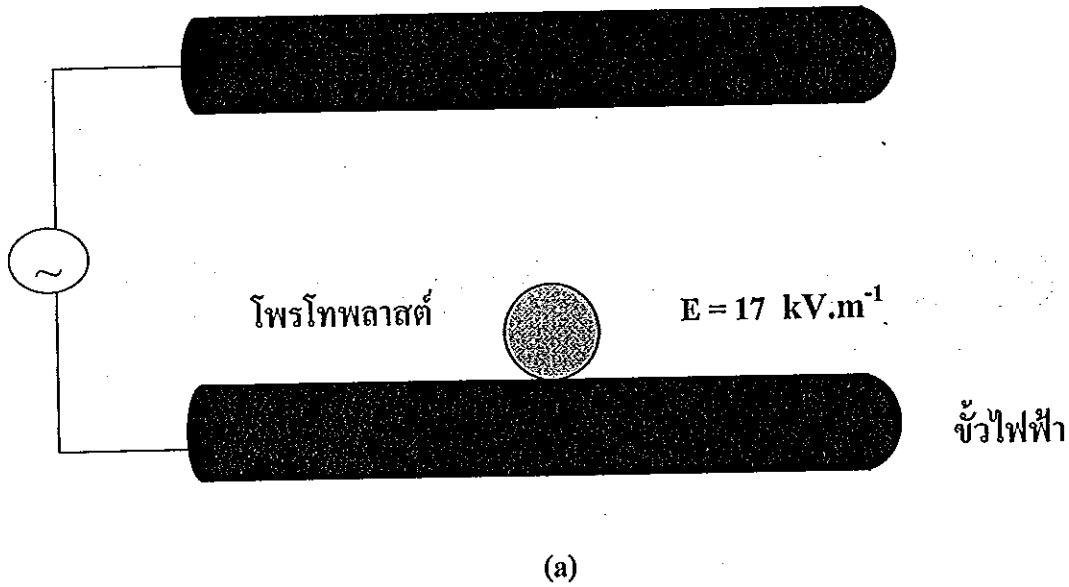
หลังจากที่โพรโทพลาสต์ถูกยึดกับขั้วไฟฟ้าแล้วทำการทดลองดังนี้

2.1) เลือกความเข้มข้นไฟฟ้า 4 ค่า คือ  $30 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  และเลือกศึกษาในช่วงความถี่ 0.5 MHz, 1 MHz, 5 MHz และ 10 MHz ให้โพรโทพลาสต์แขวนลอยในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  การทดลองนี้จะเปลี่ยนโพรโทพลาสต์ใหม่ทุกครั้ง ที่เปลี่ยนค่าสนามหรือความถี่เพื่อต้องการข้อมูลที่เชื่อถือได้เนื่องจากแต่ละโพรโทพลาสต์จะอยู่ในสนามไฟฟ้าที่ศึกษานาน 5 นาที ซึ่งไม่ทราบว่าการทดลองแต่ละครั้งจะมีผลต่อโพรโทพลาสต์อย่างไร ทุกความเข้มข้นและความถี่ ทุกค่าการทดลองจะเก็บข้อมูลจาก 3 เซลล์ และทดลองซ้ำอีก 3 ครั้งจากโพรโทพลาสต์ต่างชุดกัน บันทึกภาพการวัดระยะยึดของโพรโทพลาสต์ตลอดการทดลองด้วยวิดีโอเพื่อศึกษาการยึดของโพรโทพลาสต์ในภายหลัง

แบ่งการวัดระยะยึดของโพรโทพลาสต์ตลอด 5 นาที เป็น 6 ช่วง โดยใช้สเกลวัดระยะตามข้อ 3.2.4 และใช้นาฬิกาจับเวลาประกอบ แต่ละช่วงทำการวัด 3 ครั้ง

2.2) ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.1) แต่ใช้สารละลายที่มี  $\sigma_s 20 \text{ mS.m}^{-1}$

2.3) นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 2.1) และ 2.2) มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ของสัดส่วนการยึดของโพรโทพลาสต์ (a/b) เทียบกับเวลา ที่ความเข้มข้นไฟฟ้า และ ความถี่ต่างๆ กัน (ตามผลข้อ 4.4.1 และ 4.4.2)



ภาพประกอบ 16 การเหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ให้เกาะขั้วไฟฟ้า (a) และศึกษาการยึดของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้าขนาดต่างๆ กัน (b)

### 3) ศึกษาผลของเวลาในสนามไฟฟ้าต่อการกินรูปของโพรโทพลาสต์

การทดลองนี้ใช้โพรโทพลาสต์เดียวกันตลอด โดยเปลี่ยนเวลาที่ให้สนามไฟฟ้าแก่โพรโทพลาสต์จาก 1 นาที เพิ่มขึ้นอีก 5 ช่วงเวลาจนครบ 20 นาที จับเวลาตั้งแต่หยุดให้สนาม จนกระทั่งเมื่อโพรโทพลาสต์หยุดการกินรูปต่อไป และการศึกษานี้ใช้สารละลาย  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  เนื่องจากเป็นสภาพนำไฟฟ้าเฉลี่ยระหว่างค่าต่ำและค่าสูงของการทดลองข้างต้นกล่าวคืออยู่ระหว่าง  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  และ  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  ซึ่งจะนำผลที่ได้ไปใช้ประกอบในการศึกษาการดูดซึมอาหารของโพรโทพลาสต์ต่อไป เลือกศึกษาที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 3 ค่า คือ  $45 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  ที่ความถี่ 1 MHz เวลาในการกินรูปของโพรโทพลาสต์ สามารถนำไปวิเคราะห์หาความหนืดของเยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์ แต่อย่างไรก็ดีจะต้องทราบมอดูลัสเฉือนของโพรโทพลาสต์ด้วย (Engelhardt and Sackmann, 1988)

#### 3.3.5 การหาความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตกในสนามไฟฟ้าต่างกัน

การทดลองนี้เริ่มต้นด้วยการให้โพรโทพลาสต์เกาะขั้วไฟฟ้าเหมือนข้อ 3.3.4 แต่ให้โพรโทพลาสต์แขวนลอยในสารละลายสภาพนำไฟฟ้า  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  การเปลี่ยนความเข้มสนามไฟฟ้าทำนองเดียวกัน คือ  $30 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  เริ่มต้นให้ความถี่ 1 MHz สังเกตผลแล้วลดความถี่ลงจนถึงความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตก (ประมาณ 10 kHz) แต่จะความถี่จะใช้เวลาสังเกตผลนาน 1 นาที หรือจนกระทั่งโพรโทพลาสต์แตก โดยรอให้โพรโทพลาสต์กินรูปก่อนเปลี่ยนความถี่ทุกครั้ง แล้วให้เวลาโพรโทพลาสต์ปรับตัวอีก 1 นาที

#### 3.3.6 วิเคราะห์การยึดของโพรโทพลาสต์เทียบกับทฤษฎี

นำค่าจริงของฟังก์ชันความถี่  $\text{Re}[f(\omega)]$  ที่ได้จากการประมาณค่าคงที่ทางไฟฟ้าของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. (สรวิณี, 2541) และสัดส่วนการยึด  $a/b$  มาคำนวณหาค่าคงที่ของการยึด (K) จากสมการที่ (17) (บทที่ 2) และยังมีมอดูลัสของโพรโทพลาสต์ (Y) จากความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นกับความเครียด (ตามผลข้อ 4.5.2) ตามทฤษฎีแรงดึงเนื่องจากสนามไฟฟ้าตามข้อ 2.3 ในบทที่ 2

#### 3.3.7 ศึกษาผลกระทบของสนามไฟฟ้าต่อการดูดซึมฟอสเฟตของโพรโทพลาสต์

โดยวิธีไอโซโทปรังสี P-32

การศึกษานี้เลือกสารละลายเกลือรังสี  $\text{NH}_4\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$  ติดตามการดูดซึมฟอสเฟตของโพรโทพลาสต์โดยที่อนุมูลฟอสเฟต ( $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ ) เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยง

โพรโทพลาสต์ (ภาคผนวก 1) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1) การเตรียมโพรโทพลาสต์ และเหนียวนำด้วยไฟฟ้ากระแสสลับ

1.1) เตรียมโพรโทพลาสต์ตามข้อ 1-3 ของวิธีการ 3.3.3 นำไปแขวนลอยในสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  ที่มีสภาพนำไฟฟ้า  $10 \text{ mS.m}^{-1}$

1.2) ปรับความหนาแน่นโพรโทพลาสต์ให้ได้ประมาณ  $2 \times 10^4$  per ml จำนวน 5 ml เพื่อแบ่งออกเป็น 4 ชุด ให้เป็นชุดควบคุม และชุดทดลองที่ใช้ความเข้มข้นสนามไฟฟ้า  $17 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  ความถี่คงที่ 1 MHz

1.3) แบ่งโพรโทพลาสต์  $500 \mu\text{l}$  ใส่จานหลุม แล้วเหนียวนำโพรโทพลาสต์ หลุมละ 2 ตำแหน่ง ที่มีระยะห่างกันพอที่จะไม่ทำให้โพรโทพลาสต์ บางส่วนถูกเหนียวนำซ้ำ โดยเหนียวนำตำแหน่งละ 1 นาที โพรโทพลาสต์แต่ละชุดเหนียวนำ 2 ครั้ง แล้วรวมโพรโทพลาสต์เข้าด้วยกันเพื่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะนำไปศึกษาด้วยวิธีไอโซโทปริงส์

1.4) ทำตามข้อ 1.1) – 1.3) ข้างต้น แต่เปลี่ยนเวลาในการเหนียวนำเป็น 3 และ 5 นาที ตามลำดับ

1.5) ล้างโพรโทพลาสต์ที่ผ่านการเหนียวนำ และโพรโทพลาสต์ในชุดควบคุม 2 ครั้งด้วยสารละลายสูตรอาหารเหลว VW ของโพรโทพลาสต์ โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วปรับปริมาตรโพรโทพลาสต์ให้ได้ 1 ml

อนึ่งเนื่องจากสูตรอาหาร VW เดิมมีซูโครสเป็นส่วนผสมแต่การทดลองนี้ได้แขวนลอยโพรโทพลาสต์ในแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  จึงใช้แมนนิทอลแทนซูโครสในสูตรอาหารเดิม

2) วิธีการศึกษาการดูดซึมฟอสเฟตด้วยสารรังสี  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$

2.1) เจือจางสารละลายของ  $\text{NH}_4\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$  จำนวนหนึ่ง ให้ได้

ปริมาตร 1 ml

2.2) เติมสารละลายเกลือรังสีเจือจางปริมาตร  $50 \mu\text{l}$  ลงในสารละลายที่มีโพรโทพลาสต์ทุกชุด ซึ่งจะทำการละลายที่มีโพรโทพลาสต์แขวนลอยอยู่มีความเข้มข้นรังสี  $0.01 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$  (Suttle and Harrison, 1988)

2.3) วางทิ้งไว้ในชุดป้องกันรังสี ที่อุณหภูมิ  $28^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้  
โพรโทพลาสต์ดูดซึมสารรังสี

2.4) สุ่มตัวอย่าง 3 ครั้ง ครั้งละ 200  $\mu\text{l}$  เพื่อนำมากรองด้วยชุดกรอง  
สูญญากาศ ล้างสารรังสีที่เปื้อนผิวโพรโทพลาสต์ และที่อยู่บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น  
1 ml รอให้กระดาษกรองแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาหาอัตรานับรังสีด้วยเครื่องวัดรังสี

เนื่องจากการทดลองนี้ทำในช่วงเวลาต่างกัน 3 ครั้ง จึงจำเป็นต้องทราบ  
ความแรงรังสีในสารละลายที่แขวนลอยโพรโทพลาสต์ เพื่อสามารถนำมาปรับเทียบอัตรา  
นับรังสีที่ได้แต่ละครั้ง จึงจะสามารถเปรียบเทียบผลการทดลองได้ ซึ่งทำได้ดังนี้ คือเตรียม  
สารละลายน้ำเลี้ยงโพรโทพลาสต์ให้มีปริมาตร และปริมาณสารรังสีเหมือนชุดทดลองข้อ  
3.3.7 แต่ไม่มีโพรโทพลาสต์ แล้วสุ่มตัวอย่างมาวัดรังสีครั้งละ 20  $\mu\text{l}$  หยดลงบนภาชนะ  
โลหะ ทำให้แห้งโดยการระเหยด้วยความร้อน วัดปริมาณรังสีบนภาชนะในหน่วย cpm และ  
การหาความแรงรังสีจำเพาะของสารละลาย (ภาคผนวก 4) เพื่อนำไปหาค่าฟลักซ์ และตรวจ  
สอบการมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าในเงื่อนไขเดียวกัน  
(ภาคผนวก 3)

## บทที่ 4

### ผลและการอภิปรายผล

#### 4.1 สารละลายเอนไซม์ผสมสำหรับแยกโพรโทพลาสต์จากแผ่นใบ

การย่อยใบกล้วยไม้กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.) เพื่อให้ได้โพรโทพลาสต์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ผสม 4 สูตรเพื่อเปรียบเทียบผลดังแสดงในตาราง 1 โดยให้เวลาในการย่อยคงที่ 3 ชั่วโมง ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง พบว่าเอนไซม์กลุ่มแรกที่เปรียบเทียบผลของ Driselase นั้นคือสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 สูตรที่ 1 สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้ดีกว่าเมื่อมี Driselase เป็นส่วนประกอบด้วย และกลุ่มที่สองเปรียบเทียบผลของ Cellulase ในสูตรที่ 3 เพิ่มความเข้มข้นของ Cellulase จาก 1% (ในสูตรที่ 1) เป็น 2% โดยคงที่เอนไซม์ชนิดอื่นพบว่าให้โพรโทพลาสต์มากที่สุด ส่วนสูตรที่ 4 เพิ่มความเข้มข้นของ Cellulase จาก 1% (ในสูตรที่ 2) เป็น 2% เป็นการยืนยันว่าแม้มีเอนไซม์ Cellulase เป็นส่วนประกอบมากแต่ถ้าขาด Driselase จะย่อยใบได้ไม่ดี

ตาราง 1 จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากเอนไซม์ผสมทั้ง 4 สูตร โดยใช้เวลาในการย่อย 3 ชั่วโมง

ชนิดของเอนไซม์ผสม	จำนวน โพร โทพลาสต์ ( $\times 10^4$ per ml)
Cellulase1%, Driselase1%, Marcerozyme0.5%	$4.57 \pm 0.67$
Cellulase1%, Marcerozyme0.5%	$2.38 \pm 0.54$
Cellulase2%, Driselase1%, Marcerozyme0.5%	$5.97 \pm 0.34$
Cellulase2%, Marcerozyme0.5%	$3.57 \pm 0.60$

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเมื่อย่อยเซลล์ใบด้วยเอนไซม์สูตรที่ 3 นาน 2 ชั่วโมง ยังไม่เพียงพอที่จะได้โพรโทพลาสต์มากตามต้องการ การศึกษาขั้นตอนนี้จึงต้องการหาเวลาที่ย่อยเซลล์ใบเพื่อให้ได้โพรโทพลาสต์มากที่สุด ตาราง 2 เปรียบเทียบเวลาที่ย่อยเซลล์ใบจาก

3 ชั่วโมง ถึง 5 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้มากกว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง ส่วนที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่ามีโพรโทพลาสต์บางส่วนแตก คาดว่าเกิดจากเอนไซม์ทำลายเยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์ จึงสรุปว่าหากจะย่อยเซลล์ใบของกล้วยไม้ด้วยเอนไซม์สูตรที่ 3 ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง จึงจะให้โพรโทพลาสต์มากพอ โพรโทพลาสต์นี้มีขนาดเฉลี่ย  $50.22 \pm 2.04 \mu\text{m}$  (ภาคผนวก 5)

ตาราง 2 จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกด้วยเอนไซม์สูตรที่ 3

เวลา (h)	จำนวนโพรโทพลาสต์ ( $\times 10^4$ per ml)
3	$5.67 \pm 0.49$
4	$10.07 \pm 0.85$
5	$4.63 \pm 0.76$

#### 4.2 ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยโพรโทพลาสต์

นำโพรโทพลาสต์ขนาดประมาณ 48 - 52  $\mu\text{m}$  ซึ่งแยกด้วยสารละลายเอนไซม์ผสมสูตรที่ 3 ไปแขวนลอยในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลที่มีความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0.3  $\text{kmol.m}^{-3}$ , 0.4  $\text{kmol.m}^{-3}$ , 0.5  $\text{kmol.m}^{-3}$ , 0.6  $\text{kmol.m}^{-3}$  และ 0.7  $\text{kmol.m}^{-3}$  แต่ละชุดนาน 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่ยังคงรูปทรงกลมดังแสดงในตาราง 3 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 0.5  $\text{kmol.m}^{-3}$  มีเปอร์เซ็นต์ของโพรโทพลาสต์ที่ยังคงรูปทรงกลมสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3  $\text{kmol.m}^{-3}$  และ 0.4  $\text{kmol.m}^{-3}$  จะมีโพรโทพลาสต์แตก เป็นไปได้ว่าความดันออสโมติกภายนอกต่ำกว่าภายใน น้ำจากภายนอกจะเคลื่อนที่เข้า ให้โพรโทพลาสต์แตก และพบว่าที่ความเข้มข้น 0.5  $\text{kmol.m}^{-3}$ , 0.6  $\text{kmol.m}^{-3}$  และ 0.7  $\text{kmol.m}^{-3}$  พบโพรโทพลาสต์เหี่ยวทั้งนี้อาจเนื่องจากความดันออสโมติกภายนอกสูงกว่าภายใน น้ำจากภายในโพรโทพลาสต์แพร่ออกจึงทำให้โพรโทพลาสต์เหี่ยว

การพบว่าความเข้มข้น 0.7  $\text{kmol.m}^{-3}$  มีโพรโทพลาสต์เหี่ยวมากกว่าที่ 0.5  $\text{kmol.m}^{-3}$  จึงสมเหตุสมผล แสดงว่าความดันออสโมติกของโพรโทพลาสต์น่าจะอยู่ระหว่าง 0.4  $\text{kmol.m}^{-3}$  ถึง 0.5  $\text{kmol.m}^{-3}$  จากการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้น 0.5  $\text{kmol.m}^{-3}$  สำหรับ

แวนลอยโพรโทพลาสติกเพื่อการทดลองขั้นต่อไป

ตาราง 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโพรโทพลาสติกที่ยังเป็นทรงกลมเมื่อแวนลอยในสารละลายแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน

ความเข้มข้นของสารละลาย ( $\text{kmol.m}^{-3}$ )	จำนวนโพรโทพลาสติกเริ่มต้น	จำนวนโพรโทพลาสติกที่เวลา 24 ชั่วโมง	เปอร์เซ็นต์ของโพรโทพลาสติกที่ยังเป็นทรงกลม	ลักษณะโพรโทพลาสติกที่เสียรูปจากการสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์
0.3	$53.00 \pm 2.00$	$32.33 \pm 2.64$	$61.00 \pm 3.31$	แตก
0.4	$51.33 \pm 3.04$	$37.00 \pm 2.65$	$72.08 \pm 4.03$	แตก
0.5	$54.67 \pm 3.51$	$47.67 \pm 5.59$	$87.20 \pm 6.60$	เหี่ยว
0.6	$51.67 \pm 2.50$	$40.00 \pm 1.00$	$77.41 \pm 2.69$	เหี่ยว
0.7	$54.33 \pm 2.33$	$37.00 \pm 1.00$	$68.10 \pm 2.54$	เหี่ยว

#### 4.3 สเปกตรัมไดอิเล็กโตรฟอเรติกของโพรโทพลาสติกและกลุ่มโพรโทพลาสติกภายใต้เงื่อนไขความเข้มข้นไฟฟ้าและสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย

##### 4.3.1 สเปกตรัมไดอิเล็กโตรฟอเรติกของโพรโทพลาสติก

การทดลองนี้เพื่อหาเงื่อนไขความเข้มข้นไฟฟ้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดแรงชนิดบวกกับโพรโทพลาสติกซึ่งมีขอบเขตความถี่ขอบต่ำและสูง ( $f_1$ - $f_2$ ) เนื่องจากในการศึกษาผลของสนามไฟฟ้ากระแสสลับต่อการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสติกในขั้นตอนนี้จะศึกษาขณะที่โพรโทพลาสติกเกาะขั้วไฟฟ้า การศึกษานี้ได้ค้นพบความถี่ของสัญญาณไฟฟ้า เมื่อให้สารละลายน้ำตาลที่แวนลอยโพรโทพลาสติกมีสภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$ ,  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  และ  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  เพิ่มความเข้มข้นไฟฟ้าโดยวิธีเพิ่มความต่างศักย์ระหว่างขั้วไฟฟ้า ผลที่ได้แสดงในตาราง 4 จะเห็นว่าที่ทุกชุดการทดลองความถี่ 15 MHz เป็นค่าสูงสุดเนื่องจากเป็นขีดจำกัดของเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า จึงไม่สามารถหาสเปกตรัมความถี่ขอบสูง การทดลองนี้จึงแสดงผลได้เฉพาะความถี่ขอบต่ำพิจารณาที่  $\sigma_1$   $1 \text{ mS.m}^{-1}$  การเพิ่มสนามไฟฟ้าจาก  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  ถึง  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  มีผลให้ขอบเขตความถี่ต่ำเพิ่มขึ้นจาก 3 kHz เป็น 155 kHz เมื่อเพิ่ม

$\sigma_s$  เป็น  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  ความเข้มสนามไฟฟ้ามีผลต่อขอบเขตความถี่ต่ำเช่นเดียวกัน กล่าวคือ ขอบเขตความถี่ต่ำเพิ่มจาก 8 kHz ถึง 163 kHz และเมื่อ  $\sigma_s$  เป็น  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  ขอบเขตความถี่ต่ำเพิ่มจาก 23 kHz ถึง 187 kHz สรุปได้ว่าเมื่อความเข้มสนามไฟฟ้าค่าสูง ขอบเขตความถี่ต่ำของโพรโทพลาสต์จะเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อ  $\sigma_s$  มีค่าสูง ขอบเขตความถี่ต่ำจะเพิ่มขึ้นด้วย

นอกจากนี้พบว่าขณะที่โพรโทพลาสต์เคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า โพรโทพลาสต์จะยึดออกโดยหันด้านยาวเข้าหาขั้วไฟฟ้า ถ้าสนามไฟฟ้ามีความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  จากการทดลองนี้ทำให้สามารถเลือกความเข้มสนามไฟฟ้าเพื่อศึกษาการเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ในขั้นตอนต่อไปได้ กล่าวคือเมื่อต้องการให้โพรโทพลาสต์เกาะขั้วไฟฟ้า เลือกความเข้มสนามขนาด  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  และศึกษาการยึดของโพรโทพลาสต์ที่สนามมากกว่าหรือเท่ากับ  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  อย่างไรก็ตามโพรโทพลาสต์ที่ให้สนามไฟฟ้า  $30 \text{ kV.m}^{-1}$  มีการยึดแต่ต้องสังเกตผลโดยวิธีวัดความยาว ดังนั้นการทดลองตอนที่ 4 จึงใช้ความเข้มสนามไฟฟ้า  $30 \text{ kV.m}^{-1}$  ด้วย

ตาราง 4 เปรียบเทียบสเปกตรัม DEP ของโพรโทพลาสต์

สภาพนำไฟฟ้า $\sigma_s \text{ (mS.m}^{-1}\text{)}$	ความเข้มสนามไฟฟ้า $(\text{kV.m}^{-1}\text{)}$	$f_1-f_2$
1	17	$3.00 \pm 2 \text{ kHz} - 15 \text{ MHz}$
	30	$13.33 \pm 2.89 \text{ kHz} - 15 \text{ MHz}$
10	45	$20 \pm 5 \text{ kHz} - 15 \text{ MHz}$ โพรโทพลาสต์ยึดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
	60	$155 \pm 11.73 \text{ kHz} - 15 \text{ MHz}$ โพรโทพลาสต์ยึดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
	17	$8.33 \pm 6.22 \text{ kHz} - 15 \text{ MHz}$
	30	$15.67 \pm 4.08 \text{ kHz} - 15 \text{ MHz}$
	45	$26.67 \pm 7.64 \text{ kHz} - 15 \text{ MHz}$
		โพรโทพลาสต์ยึดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า

ตาราง 4 (ต่อ)

สภาพนำไฟฟ้า $\sigma_s$ (mS.m <sup>-1</sup> )	ความเข้มสนามไฟฟ้า (kV.m <sup>-1</sup> )	$f_1-f_2$
10	60	163.33±7.64 kHz – 15 kHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
20	17	23.33±2.79 kHz – 15 MHz
	30	28.33±7.63 kHz – 15 MHz
	45	60±10 kHz – 15 MHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
	60	186.67±7.63 kHz – 15 kHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า

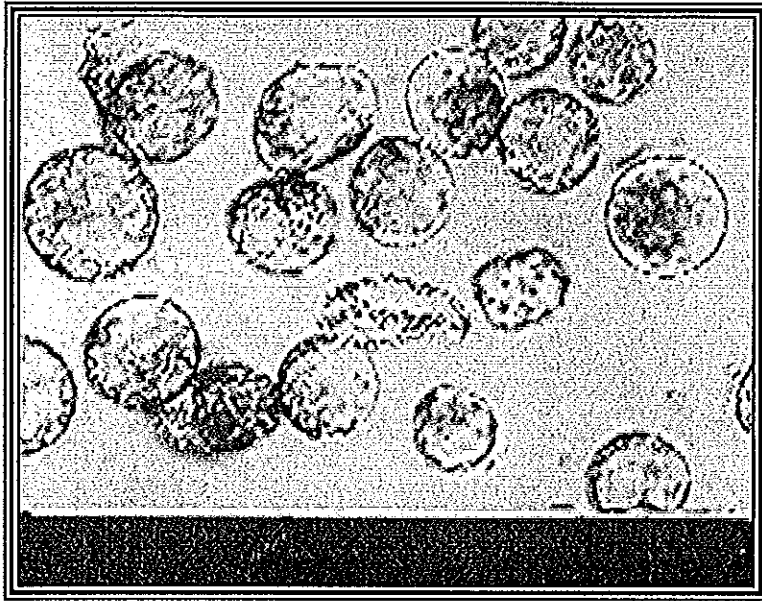
#### 4.3.2 สเปกตรัมไดอิเล็กโตรฟอเรติกของกลุ่มโพรโทพลาสต์

การทดลองนี้ได้ศึกษาสเปกตรัม DEP ของกลุ่มโพรโทพลาสต์โดยผันแปรความถี่ของสัญญาณไฟฟ้า และเลือกศึกษาที่สภาพนำไฟฟ้าเหมือนการทดลองกับโพรโทพลาสต์ข้างต้น เลือกศึกษาความหนาแน่นโพรโทพลาสต์ในช่วง  $2 \pm 0.5 \times 10^4$  per ml ผลที่ได้แสดงในตาราง 5 จะเห็นว่าที่ทุกชุดการทดลองความถี่ 15 MHz เป็นค่าสูงสุดเนื่องจากเป็นขีดจำกัดของเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า พิจารณา  $\sigma_s$  ที่ 1 mS.m<sup>-1</sup> การเพิ่มสนามไฟฟ้าจาก 17 kV.m<sup>-1</sup> ถึง 60 kV.m<sup>-1</sup> มีผลให้ขอบเขตความถี่ต่ำเพิ่มขึ้นจาก 5 kHz เป็น 215 kHz เมื่อเพิ่ม  $\sigma_s$  เป็น 10 mS.m<sup>-1</sup> ความเข้มสนามไฟฟ้ามีผลต่อขอบเขตความถี่ต่ำเช่นเดียวกัน กล่าวคือขอบเขตความถี่ต่ำเพิ่มจาก 11 kHz ถึง 253 kHz และเมื่อ  $\sigma_s$  เป็น 20 mS.m<sup>-1</sup> ขอบเขตความถี่ต่ำเพิ่มจาก 26 kHz ถึง 356 kHz จะเห็นว่าเมื่อความเข้มสนามไฟฟ้าค่าสูง ขอบเขตความถี่ต่ำของโพรโทพลาสต์จะเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกันกับเมื่อ  $\sigma_s$  มีค่าสูง ขอบเขตความถี่ต่ำจะเพิ่มขึ้นด้วย ภาพประกอบ 17 แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 17 kV.m<sup>-1</sup> จะเกิดโชนแต่โพรโทพลาสต์ไม่เปลี่ยนรูป เมื่อความเข้มสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเป็น 45 kV.m<sup>-1</sup> และ 60 kV.m<sup>-1</sup> โพรโทพลาสต์มีการยึดด้วย

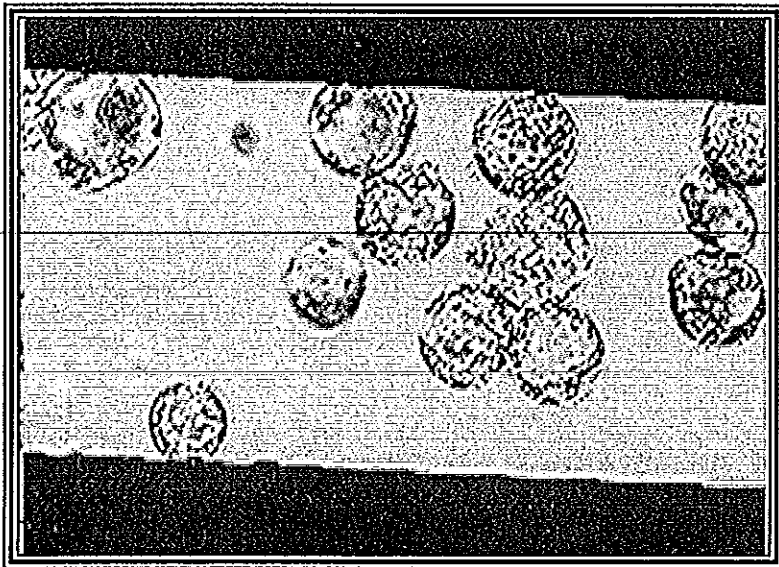
ตาราง 5 เปรียบเทียบสเปกตรัม DEP ของกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น  
 $(1.91 \pm 0.31) \times 10^4$  per ml

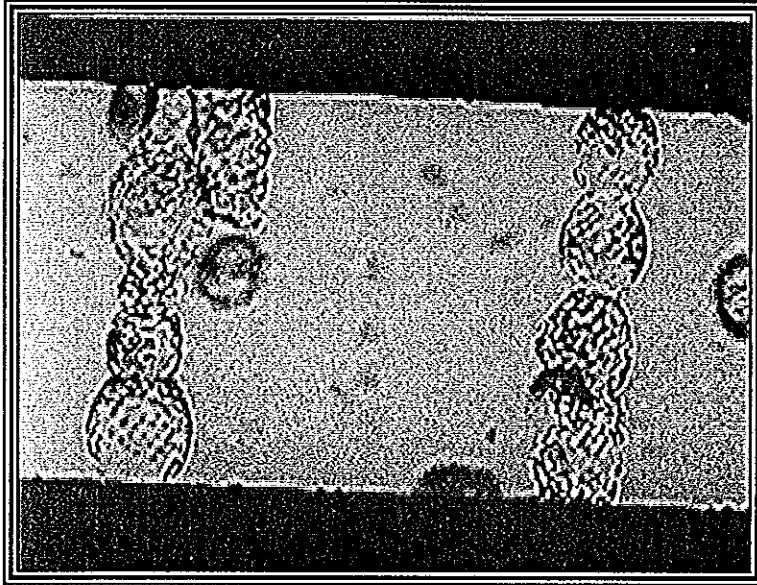
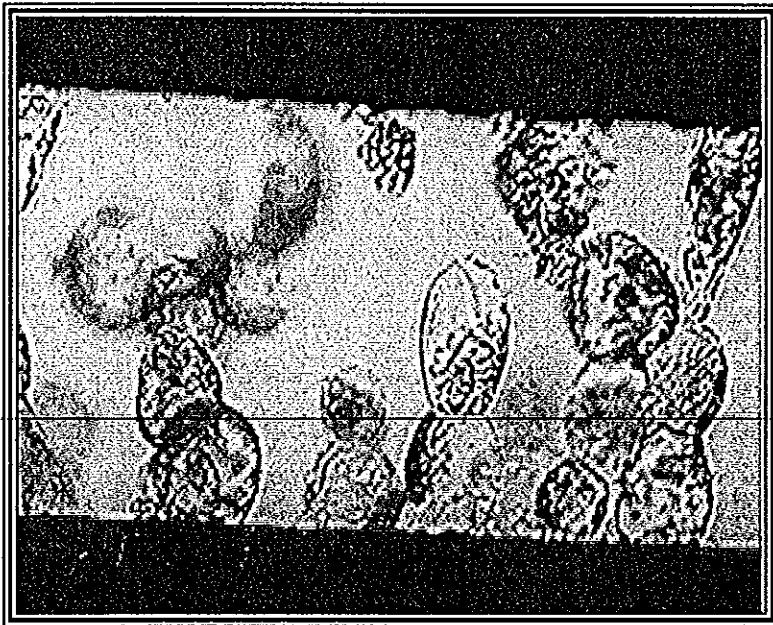
สภาพนำไฟฟ้า $\sigma_s$ (mS.m <sup>-1</sup> )	ความเข้มสนามไฟฟ้า (kV.m <sup>-1</sup> )	$f_1$ - $f_2$
1	17	5.33±2 kHz – 15 MHz
	45	30.33±6 kHz – 15 MHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
	60	215±12.33 kHz – 15 MHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
10	17	10.67±4.04 kHz – 15 MHz
	45	73.33±8.58 kHz – 15 MHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
	60	253.33±10.41 kHz – 15 kHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
20	17	25.67±5.67 kHz – 15 MHz
	45	125.33±10.63 kHz – 15 MHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า
	60	355.67±15.63 kHz – 15 kHz โพรโทพลาสต์ยัดขณะเคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า

(a)  $E = 0 \text{ kV.m}^{-1}$



(b)  $E = 17 \text{ kV.m}^{-1}$



(c)  $E$  45  $\text{kV.m}^{-1}$ (d)  $E$  60  $\text{kV.m}^{-1}$ 

ภาพประกอบ 17 การเกิดโซ่ของกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น  $1.56 \times 10^4$  per ml  
 เมื่อ  $\sigma_s$  10  $\text{mS.m}^{-1}$  ความถี่คงที่ 1 MHz  
 (a) 0  $\text{kV.m}^{-1}$  (b) 17  $\text{kV.m}^{-1}$  (c) 45  $\text{kV.m}^{-1}$  และ (d) 60  $\text{kV.m}^{-1}$

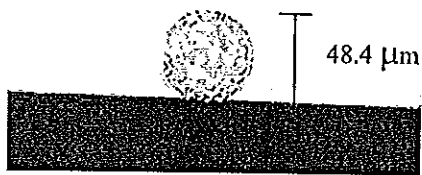
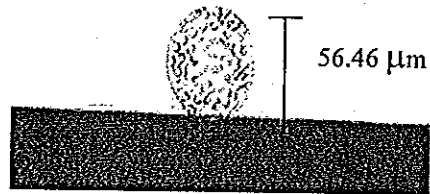
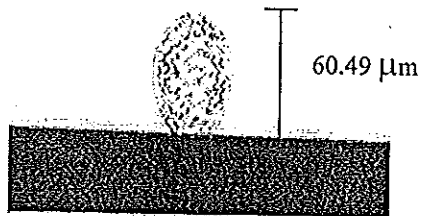
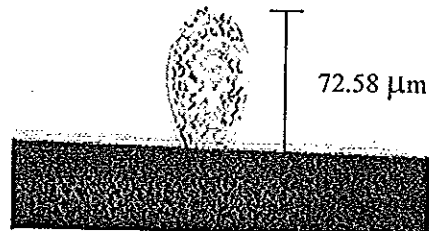
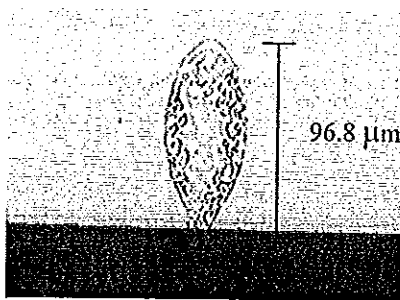
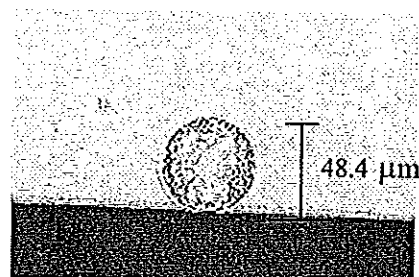
#### 4.4 การเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ

##### 4.4.1 ผลของสนามไฟฟ้าและความถี่

การทดลองนี้เปรียบเทียบการยืดของโพรโทพลาสต์กับความเข้มสนามและความถี่สัญญาณไฟฟ้า โดยทำการการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งใช้สารละลายที่มี  $\sigma_s$  20 mS.m<sup>-1</sup> พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มสนามจาก 17 kV.m<sup>-1</sup> ถึง 85 kV.m<sup>-1</sup> และหยุดให้สนามไฟฟ้า (ภาพประกอบ 18 a-f) จะเห็นว่า การยืดของโพรโทพลาสต์ไม่เท่ากันและโพรโทพลาสต์สามารถคืนรูปได้เป็นปกติเมื่อหยุดให้สนามไฟฟ้า แต่เนื่องจากการศึกษาด้านเทคโนโลยีโพรโทพลาสต์มักจะแขวนลอยโพรโทพลาสต์ในสภาพนำไฟฟ้าต่ำ การทดลองนี้จึงต้องการเปรียบเทียบผลของสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายต่อการยืดของโพรโทพลาสต์โดยใช้สารละลายที่มี  $\sigma_s$  1 mS.m<sup>-1</sup> และ 20 mS.m<sup>-1</sup>

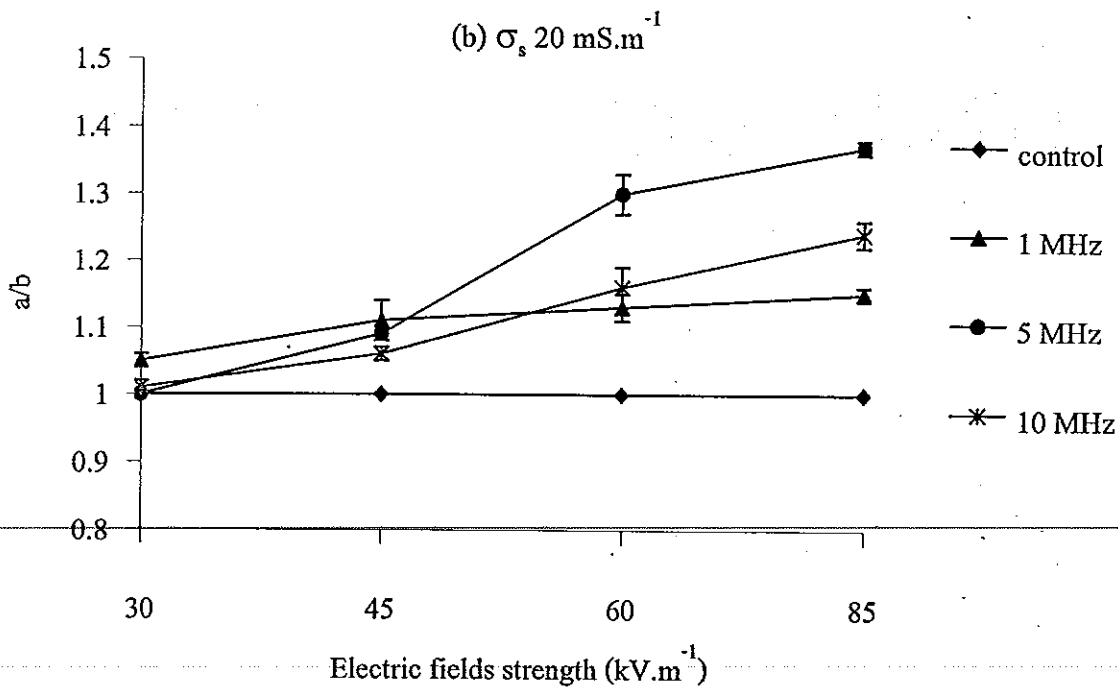
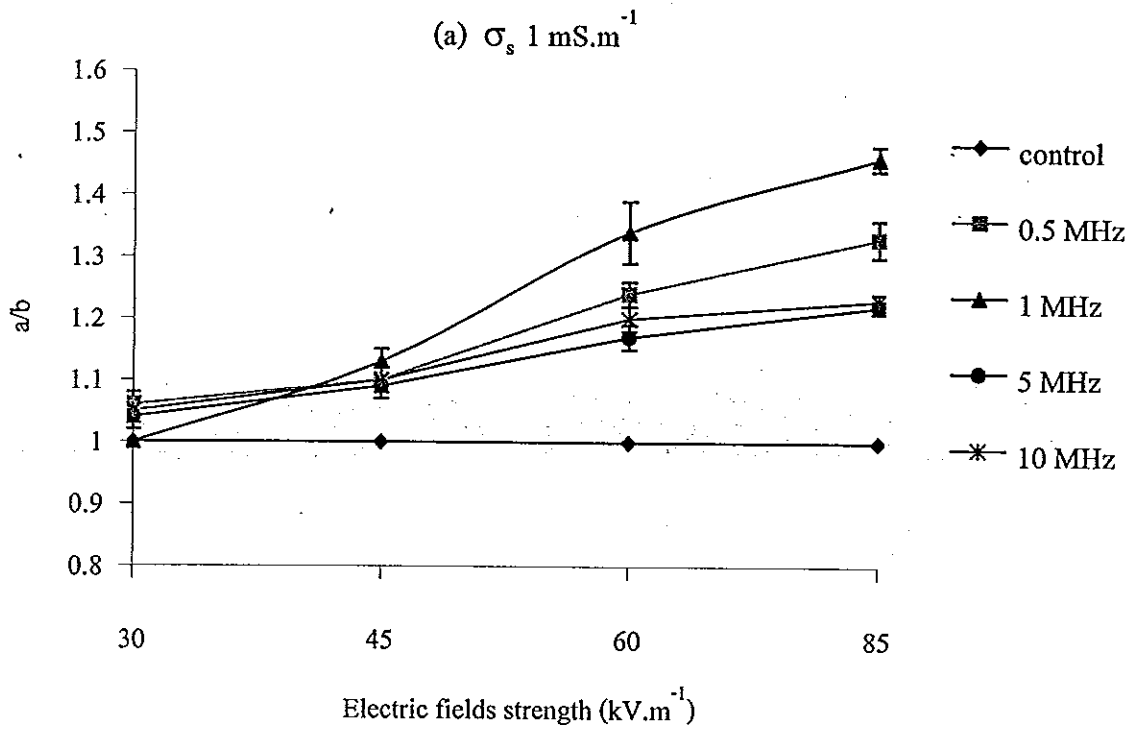
หลังจากให้โพรโทพลาสต์เคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วไฟฟ้าด้วยความเข้มสนามไฟฟ้า 17 kV.m<sup>-1</sup> ที่ความถี่ 1 MHz โดยให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามนาน 5 นาที แล้วจึงเปลี่ยนความเข้มสนามไฟฟ้าตามต้องการแต่ละค่าสนามไฟฟ้าจะเปลี่ยนความถี่ระหว่าง 0.5 MHz ถึง 10 MHz ภาพประกอบ 19 (a) แสดงสัดส่วนความยาว (a/b) ของโพรโทพลาสต์ ที่  $\sigma_s$  1 mS.m<sup>-1</sup> จะเห็นว่า a/b เพิ่มขึ้นตามความเข้มสนามไฟฟ้า ระหว่าง 30 kV.m<sup>-1</sup> ถึง 85 kV.m<sup>-1</sup> เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างความถี่ที่ใช้จะเห็นว่าที่ความถี่ 1 MHz โพรโทพลาสต์ยืดมากที่สุดถ้าความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น 60 kV.m<sup>-1</sup> และ 85 kV.m<sup>-1</sup> ภาพประกอบ 19 (b) แสดงผล a/b เมื่อเปลี่ยนสารละลาย  $\sigma_s$  เป็น 20 mS.m<sup>-1</sup> จะเห็นว่า a/b ยังคงเพิ่มขึ้นตามความเข้มสนามไฟฟ้า แต่ a/b ที่ความถี่ 1 MHz ต่ำกว่าที่ความถี่ 5 MHz ที่ความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น 60 kV.m<sup>-1</sup> และ 85 kV.m<sup>-1</sup> แต่การยืดของโพรโทพลาสต์ที่  $\sigma_s$  20 mS.m<sup>-1</sup> จะต่ำกว่าที่  $\sigma_s$  1 mS.m<sup>-1</sup> กล่าวคือที่  $\sigma_s$  1 mS.m<sup>-1</sup> ให้ค่า a/b มากที่สุดคือ  $1.46 \pm 0.02$  ที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 85 kV.m<sup>-1</sup> และ ความถี่ 1 MHz และที่  $\sigma_s$  20 mS.m<sup>-1</sup> ให้ค่า a/b มากที่สุดคือ  $1.37 \pm 0.01$  ที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 85 kV.m<sup>-1</sup> และ ความถี่ 5 MHz

พึงสังเกตว่าสนามไฟฟ้าความเข้ม 85 kV.m<sup>-1</sup>  $\sigma_s$  สูงขึ้น a/b ที่ความถี่ 5 MHz และ 10 MHz ต่างกันอย่างชัดเจน ขณะที่  $\sigma_s$  ต่ำ a/b ที่ความถี่ 5 MHz และ 10 MHz ไม่แตกต่างกันที่ทุกค่าสนามไฟฟ้า

(a)  $E = 17 \text{ kV.m}^{-1}$ (b)  $E = 30 \text{ kV.m}^{-1}$ (c)  $E = 45 \text{ kV.m}^{-1}$ (d)  $E = 60 \text{ kV.m}^{-1}$ (e)  $E = 85 \text{ kV.m}^{-1}$ 

(f) หยุดให้สนามไฟฟ้า

ภาพประกอบ 18 การยัดของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. วัดความยาว a และ b  
 ที่เวลาในสนามไฟฟ้า 1.5 นาที  $\sigma_s 20 \text{ mS.m}^{-1}$  ความถี่ 1 MHz



ภาพประกอบ 19 ผลของสนามไฟฟ้าต่อการยึดของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp.  
เมื่อเปลี่ยนแปลงความถี่ของสัญญาณ  
แต่ละข้อมูลบันทึกที่เวลา 5 นาที ของการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า  
(a)  $\sigma_s 1 \text{ mS.m}^{-1}$  และ (b)  $\sigma_s 20 \text{ mS.m}^{-1}$

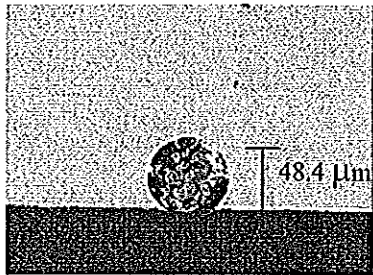
#### 4.4.2 ผลของเวลาในสนามไฟฟ้าต่อการยึดของโพรโทพลาสต์

เมื่อศึกษา  $a/b$  ในช่วง 5 นาที ที่ โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้า โดยมี  $\sigma_s$   $1 \text{ mS.m}^{-1}$  โดยวัด  $a/b$  ของโพรโทพลาสต์เป็นช่วงๆ ดังภาพประกอบ 20 (a-f) และภาพประกอบ 21 (a-d) จะเห็นว่าทันทีที่ให้สนามไฟฟ้าโพรโทพลาสต์จะยึดอย่างรวดเร็วใน 2 นาทีแรก หลังจากนั้นการยึดของโพรโทพลาสต์ค่อนข้างคงที่ ซึ่งให้ผลเดียวกันทุกค่าสนามไฟฟ้าที่ใช้ศึกษา ส่วนที่สนามไฟฟ้า  $30 \text{ kV.m}^{-1}$  พบว่า  $a/b$  ค่อนข้างคงที่ ส่วนการศึกษาในสารละลายที่มี  $\sigma_s$   $20 \text{ mS.m}^{-1}$  พบว่าการยึดของโพรโทพลาสต์มีการเปลี่ยนแปลงทำงานองเดียวกัน ดังภาพประกอบ 22 (a-d) กล่าวคือ โพรโทพลาสต์ยึดตัวเต็มที่ภายใน 2 นาที

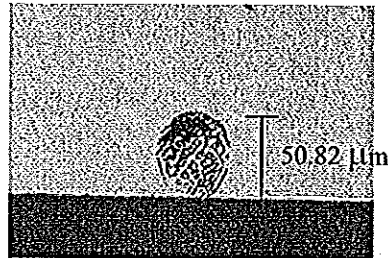
มีข้อสังเกตว่าที่ความถี่  $0.5 \text{ MHz}$  การยึดในช่วง 1.5 นาที ไม่สม่ำเสมอ และเมื่อเพิ่มสนามไฟฟ้าจาก  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  เป็น  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  โพรโทพลาสต์จะแตก ภายใน 30 วินาที ดูได้จากภาพประกอบ 23 โดยเยื่อหุ้มเซลล์ด้านตรงข้ามกับผิวที่สัมผัสขั้วไฟฟ้าจะฉีกขาดก่อนพร้อมทั้งองค์ประกอบภายในโพรโทพลาสต์จะหลุดออกมาทางด้านดังกล่าว

เพื่อตรวจสอบผลของสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย ต่อการยึดในกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่เตรียมในวันเดียวกันจึงทดลองซ้ำการทดลองข้างต้นแต่ให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้านาน 1.5 นาที ก่อนเปลี่ยนความถี่ ผลการทดลอง 3 ซ้ำจำนวน 30 โพรโทพลาสต์ ในแต่ละข้อมูล ได้แสดงในภาพประกอบ 24 (a-d) จะเห็นว่าในทุกค่าของสนามที่ใช้ พบว่าความถี่ต่ำกว่า  $1 \text{ MHz}$  สภาพนำไฟฟ้าจะมีผลต่อการยึดของโพรโทพลาสต์ ทั้งนี้สนามไฟฟ้าต้องมากกว่า  $45 \text{ kV.m}^{-1}$

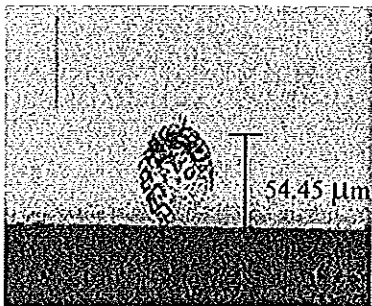
และมีข้อสังเกตว่าเมื่อโพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้า  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  ความถี่  $1 \text{ MHz}$  ที่  $\sigma_s$   $1 \text{ mS.m}^{-1}$  นานประมาณ 10 นาที จะปรากฏสารบางอย่างที่เยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์บริเวณด้านตรงข้ามกับผิวที่สัมผัสขั้วไฟฟ้า (ภาพประกอบ 25)



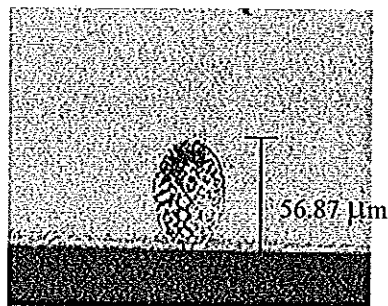
(a) 0 min



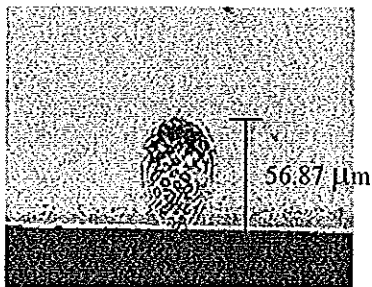
(b) 0.5 min



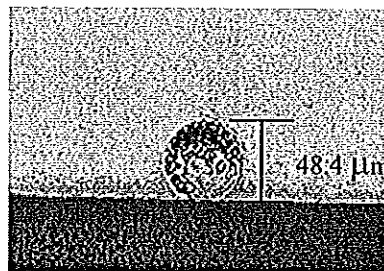
(c) 1 min



(d) 2 min



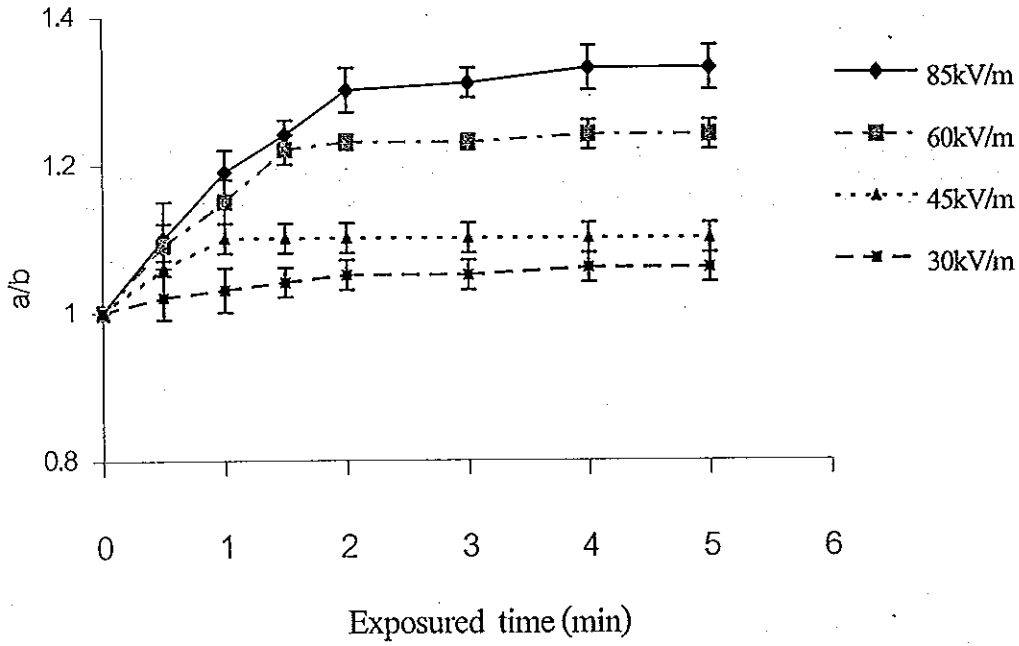
(e) 5 min



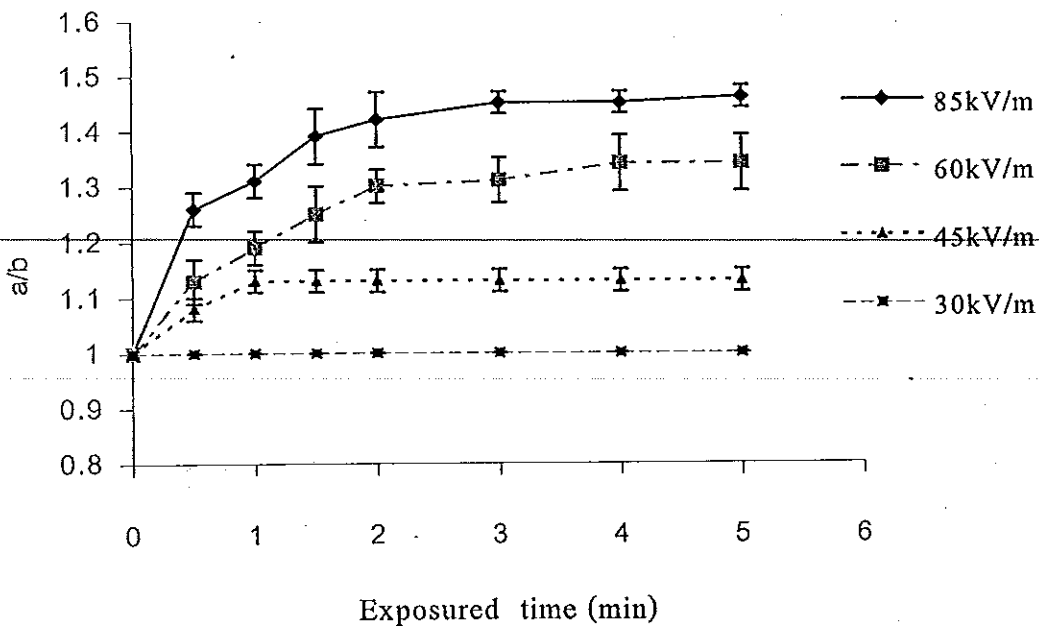
(f) หยุดให้สนามไฟฟ้า

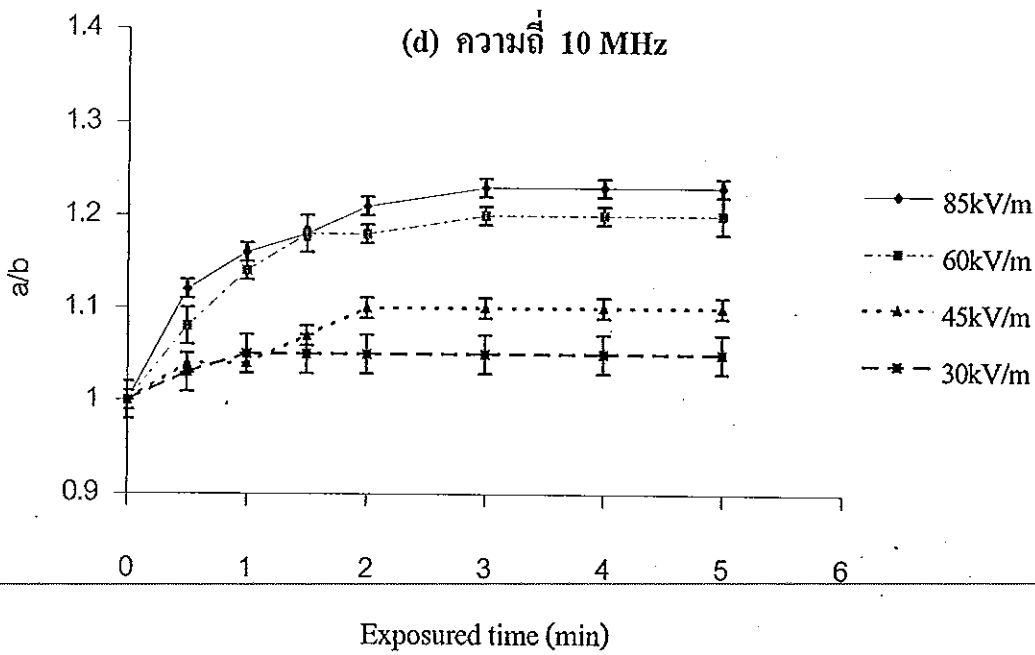
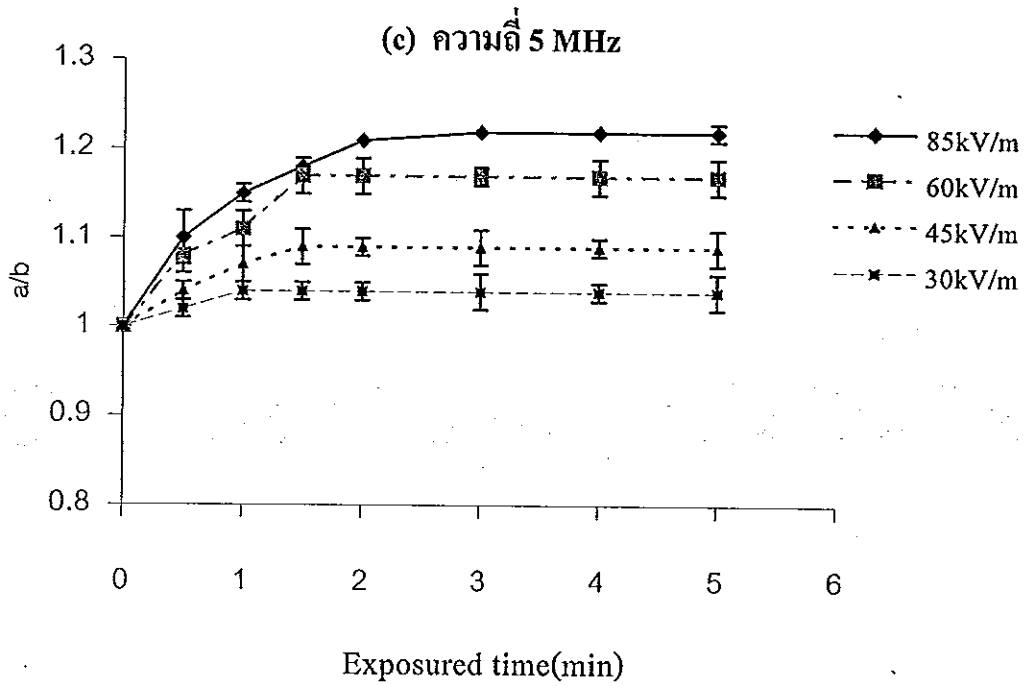
ภาพประกอบ 20 ลำดับการยืดของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. เทียบกับ เวลา ในสนามไฟฟ้า  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  และ ความถี่  $1 \text{ MHz}$  เมื่อ  $\sigma_s 1 \text{ mS.m}^{-1}$

(a) ความถี่ 0.5 MHz



(b) ความถี่ 1 MHz



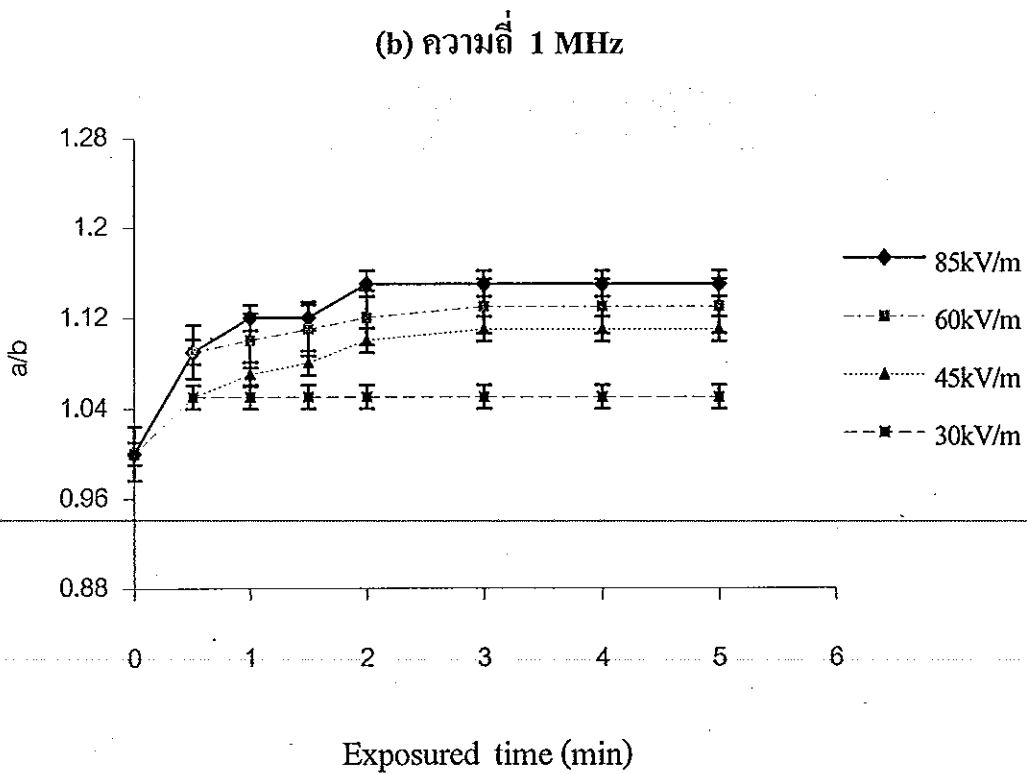
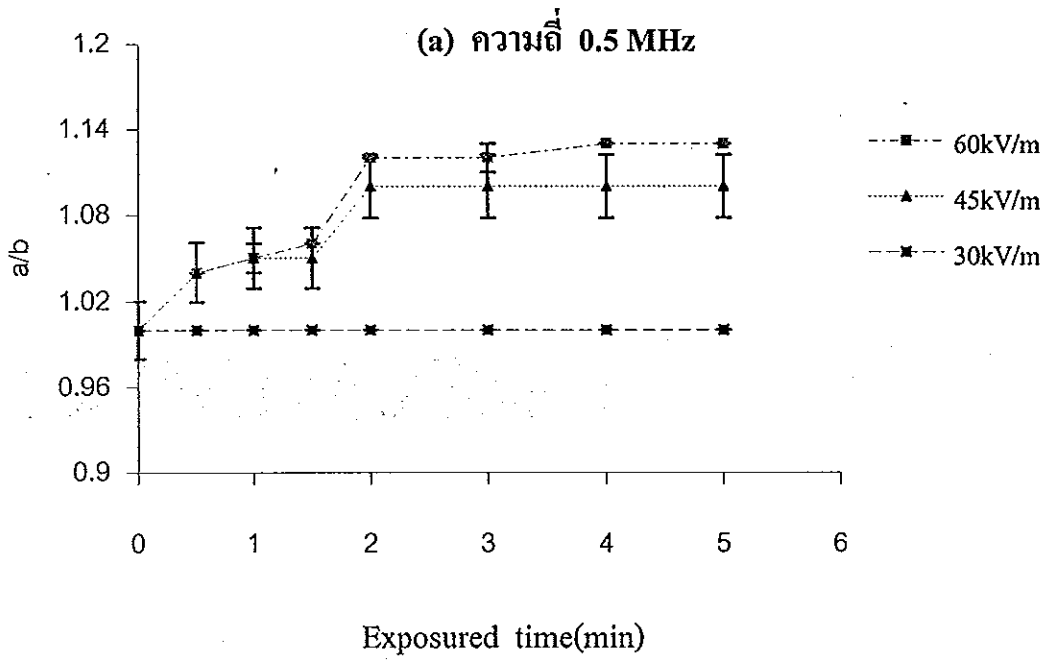


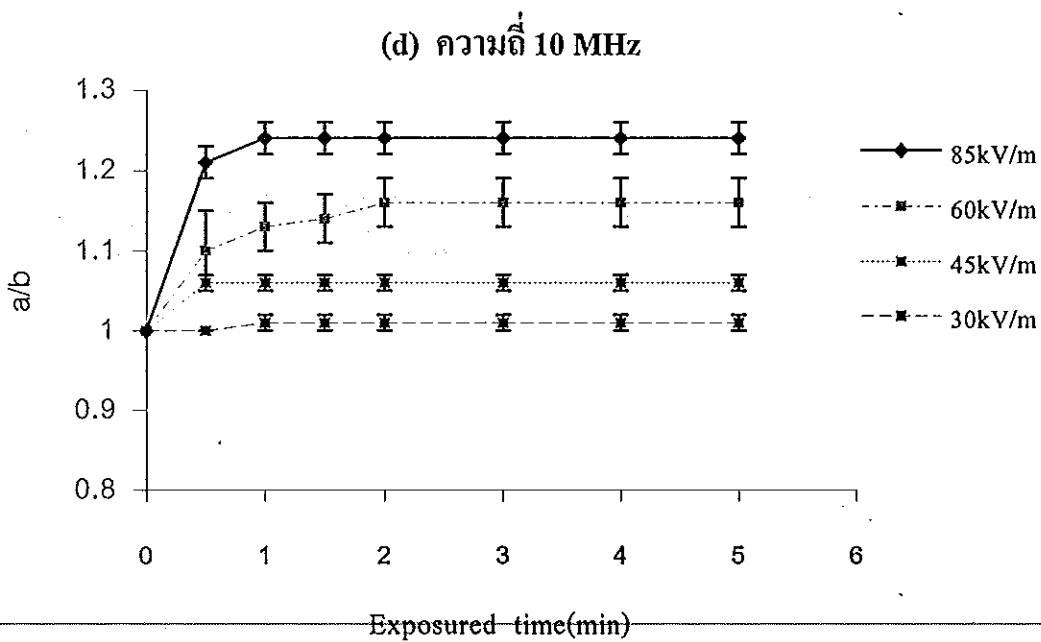
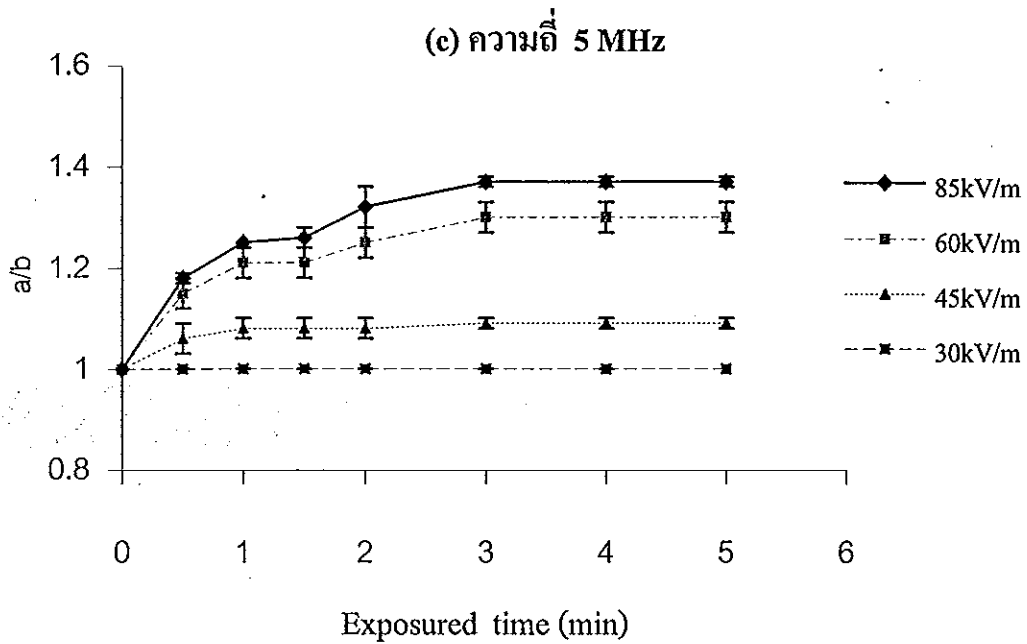
ภาพประกอบ 21 การยืดของโพรโทพลาสต์ ช่วง 5 นาที ขณะที่ถูกเหนี่ยวนำใน

สนามไฟฟ้าขนาดต่างๆ กัน เมื่อ  $\sigma_v$   $1 \text{ mS.m}^{-1}$

(a) ความถี่ 0.5 MHz (b) ความถี่ 1 MHz

(c) ความถี่ 5 MHz (d) ความถี่ 10 MHz



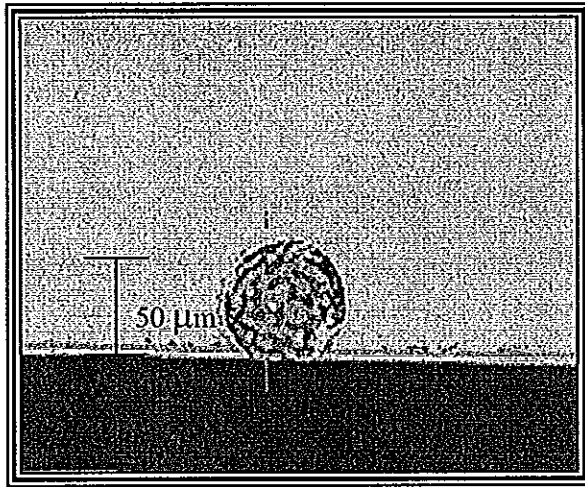
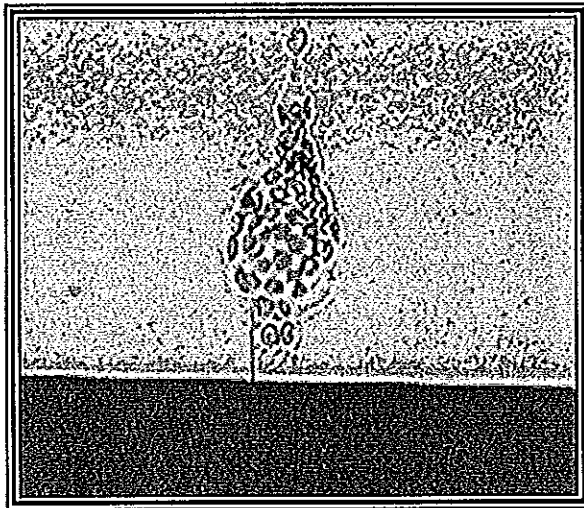


ภาพประกอบ 22 การยืดของโพรโทพลาสติกช่วง 5 นาที ขณะที่ถูกเหนี่ยวนำในสนาม

ไฟฟ้าขนาดต่างๆ กัน เมื่อ  $\sigma_s = 20 \text{ mS.m}^{-1}$

(a) ความถี่ 0.5 MHz (b) ความถี่ 1 MHz

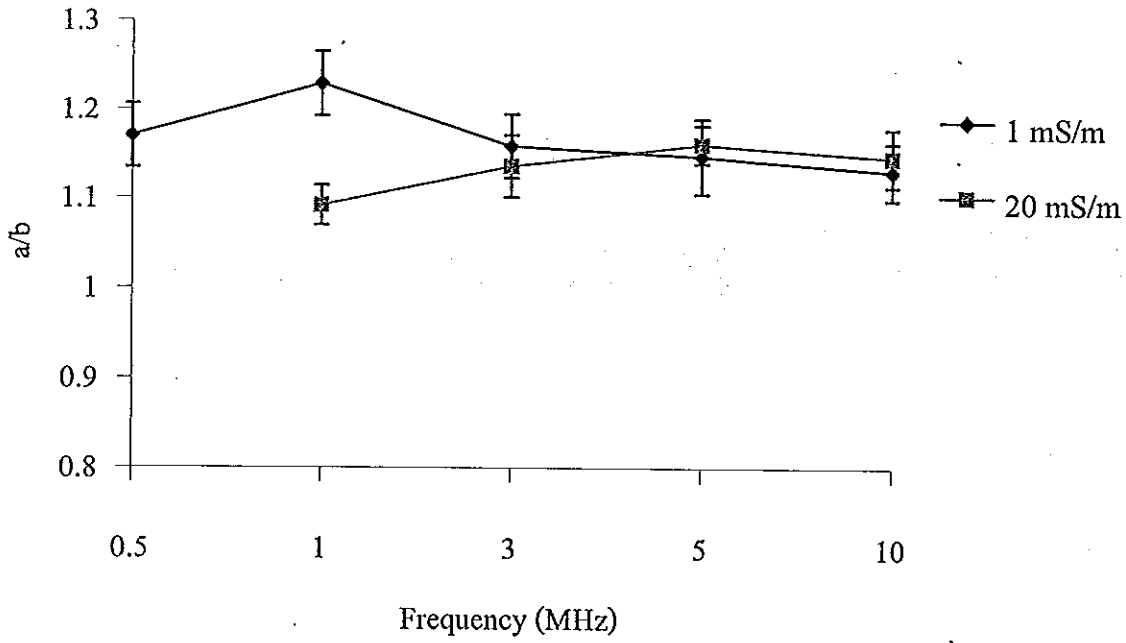
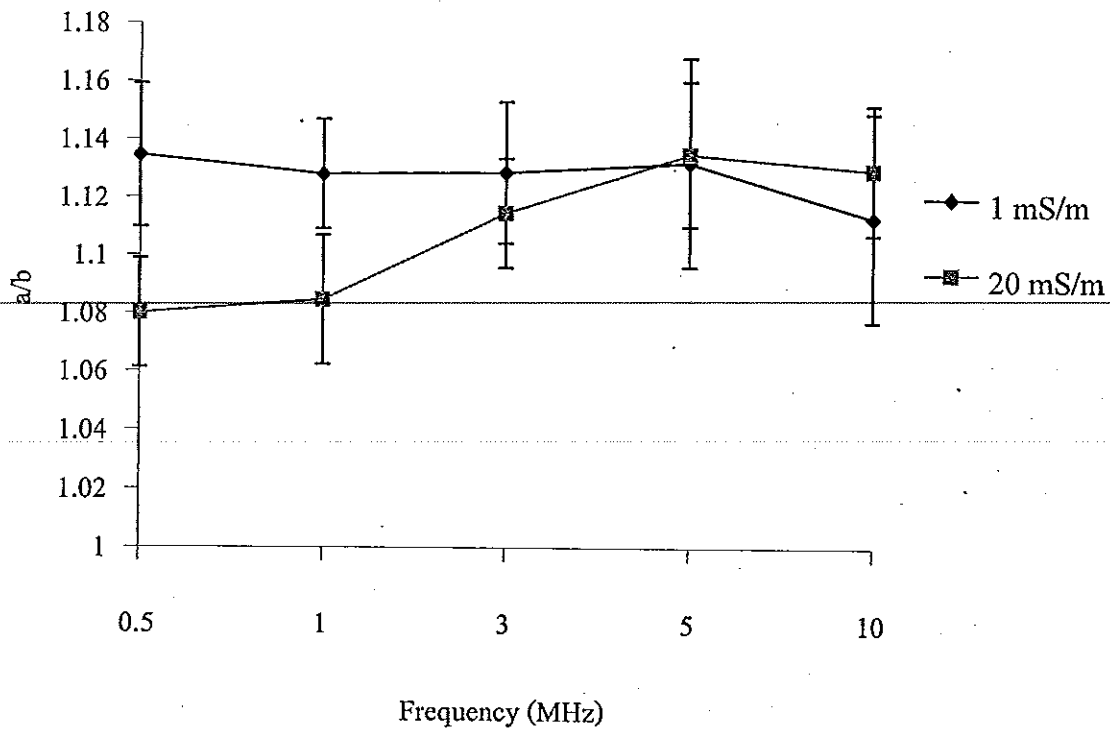
(c) ความถี่ 5 MHz (d) ความถี่ 10 MHz

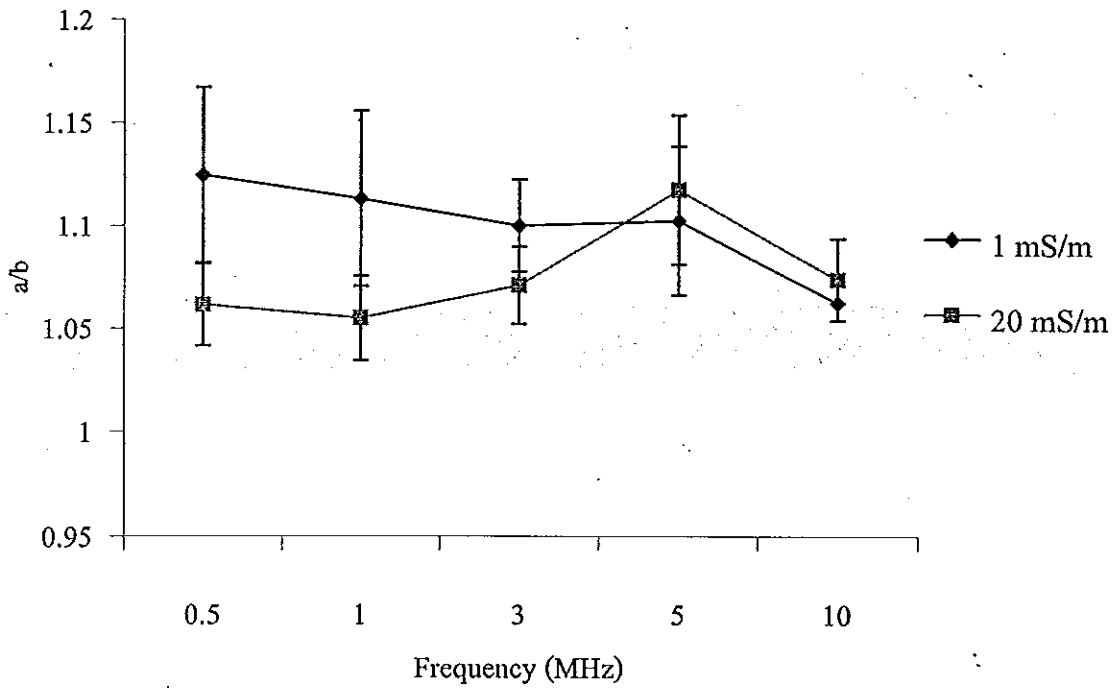
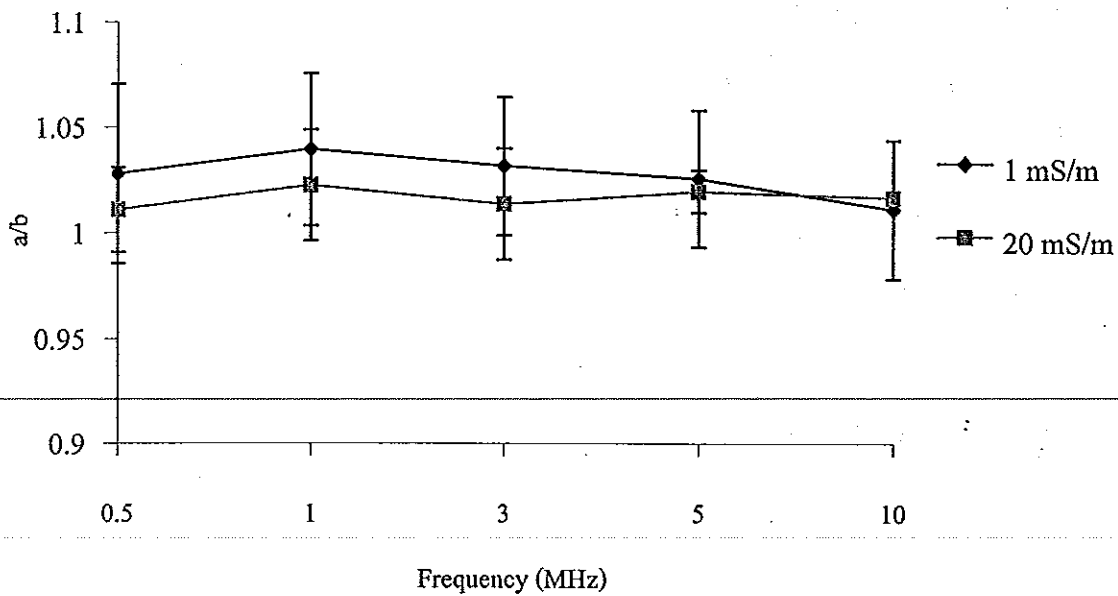
(a)  $17 \text{ kV.m}^{-1}$ (b)  $85 \text{ kV.m}^{-1}$ 

ภาพประกอบ 23 การแตกของโพรโทพลาสต์

(a) สนามไฟฟ้า  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  และความถี่ 1 MHz

(b) ความเข้มสนาม  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  ความถี่ 0.5 MHz และ  $\sigma_s 20 \text{ mS.m}^{-1}$   
หลังจากให้สนามไฟฟ้านาน 30 วินาที โพรโทพลาสต์แตก

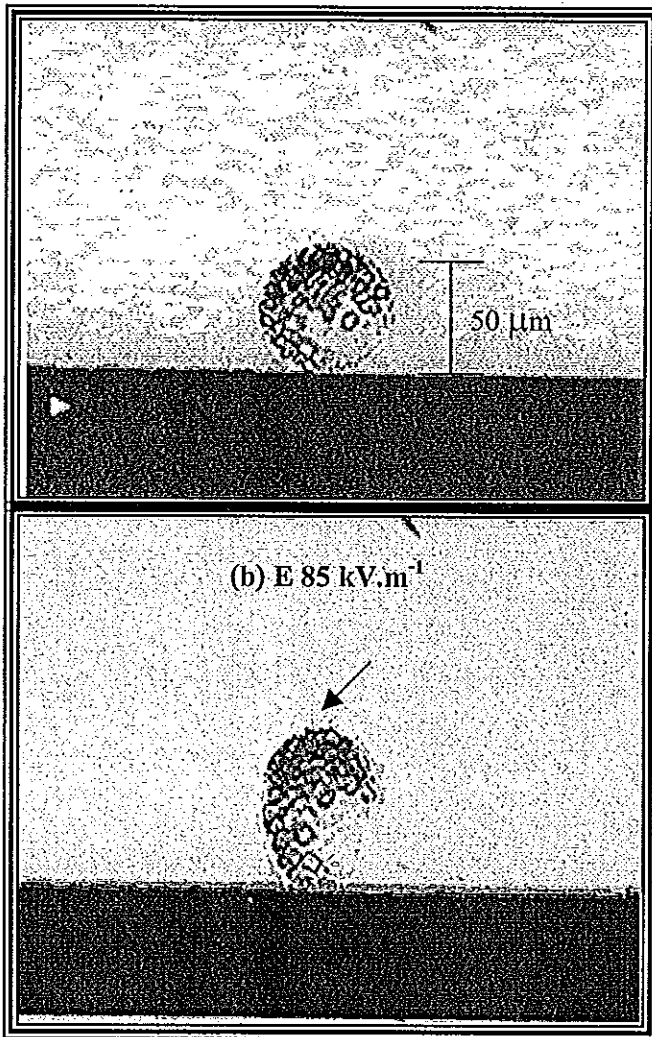
(a)  $E \ 85 \text{ kV.m}^{-1}$ (b)  $E \ 60 \text{ kV.m}^{-1}$ 

(c)  $E\ 45\ \text{kV.m}^{-1}$ (d)  $E\ 30\ \text{kV.m}^{-1}$ 

ภาพประกอบ 24 ผลการขีดของโพรโทพลาสต์เทียบกับความถี่ที่  $\sigma_s$  ต่างกัน

เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าคงที่ นาน 1.5 นาที (a)  $85\ \text{kV.m}^{-1}$ ,

(b)  $60\ \text{kV.m}^{-1}$ , (c)  $45\ \text{kV.m}^{-1}$  และ (d)  $30\ \text{kV.m}^{-1}$

(a)  $E 17 \text{ kV.m}^{-1}$ (b)  $E 85 \text{ kV.m}^{-1}$ 

ภาพประกอบ 25 เปรียบเทียบโพรโทพลาสต์เมื่อให้สนามไฟฟ้า  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  (a)

และเมื่อให้ความเข้มสนามไฟฟ้า  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  ความถี่  $1 \text{ MHz}$

สารละลายมี  $\sigma_r 1 \text{ mS.m}^{-1}$  นาน  $12$  นาที (b)

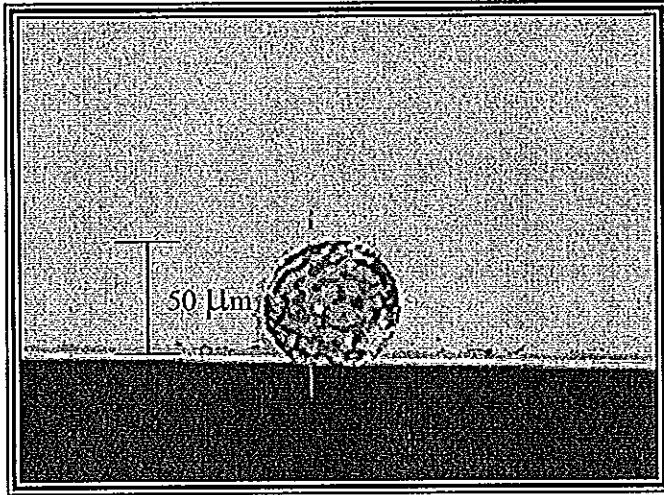
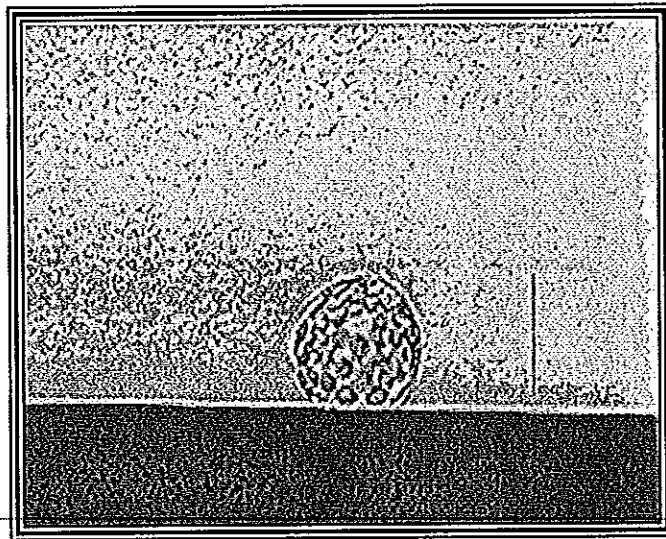
ตำแหน่งลูกศรแสดงบริเวณที่สารถูกปลดปล่อยออกจากโพรโทพลาสต์

#### 4.4.3 ผลของเวลาในสนามไฟฟ้าต่อการคืนรูปของโพรโทพลาสต์

การทดลองนี้ศึกษาเวลาที่โพรโทพลาสต์คืนรูปสู่ขนาดเดิมหลังจากหยุดให้สนามไฟฟ้า ด้วยวิธีจับเวลาโดยให้เวลาเป็น 0 วินาที ทันทีที่หยุดให้สนามไฟฟ้า เลือกศึกษาที่  $\sigma_c$  คงที่  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  โดยถือว่าเป็นสภาพนำไฟฟ้าเฉลี่ยจากสภาพนำไฟฟ้าต่ำและค่าสูง ( $1 \text{ mS.m}^{-1}$  และ  $20 \text{ mS.m}^{-1}$ ) ที่ศึกษาการยืดข้างต้น ให้ความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $45 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  และความถี่คงที่  $1 \text{ MHz}$  เปรียบเทียบผลการศึกษาในตาราง 5 ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละโพรโทพลาสต์จะถูกทดลองครบทุกช่วงเวลา จะเห็นว่าเมื่อให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามนาน 1 นาที โพรโทพลาสต์จะคืนรูปภายในเวลาประมาณ 10 วินาที เมื่อให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามนานขึ้นจนถึง 20 นาที เวลาในการคืนรูปของโพรโทพลาสต์ที่ความเข้มสนาม  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  มีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อเปลี่ยนความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  ผลการทดลองไม่แตกต่าง มีค่าเฉลี่ย  $14.84 \pm 0.36$  วินาที และที่ความเข้มสนามไฟฟ้า  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  หลังจากให้อยู่ในสนามไฟฟ้านานประมาณ 10 นาที ปรากฏว่าโพรโทพลาสต์ไม่สามารถคืนรูปให้กลมเหมือนเดิมได้ (ภาพประกอบ 26)

ตาราง 6 เปรียบเทียบเวลาที่โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้ากับเวลาในการคืนรูป  
เมื่อ  $\sigma_c 10 \text{ mS.m}^{-1}$

เวลาที่โพรโทพลาสต์ อยู่ในสนามไฟฟ้า (min)	เวลาที่โพรโทพลาสต์คืนรูป (s)		
	$45 \text{ kV.m}^{-1}$	$60 \text{ kV.m}^{-1}$	$85 \text{ kV.m}^{-1}$
1	$9.12 \pm 0.41$	$10.33 \pm 0.26$	$10.28 \pm 0.71$
3	$14.36 \pm 0.51$	$14.44 \pm 0.57$	$14.84 \pm 0.27$
5	$14.07 \pm 0.25$	$14.79 \pm 0.40$	$14.89 \pm 0.35$
10	$15.20 \pm 0.09$	$14.87 \pm 0.45$	โพรโทพลาสต์เสียรูป
15	$14.77 \pm 0.26$	$15.04 \pm 0.01$	-
20	$14.81 \pm 0.69$	$15.02 \pm 0.56$	-

(a)  $E \ 17 \text{ kV.m}^{-1}$ (b)  $E \ 85 \text{ kV.m}^{-1}$ 

ภาพประกอบ 26 การเสียดภาพของโพรโทพลาสต์โดยไม่สามารถคืนสู่รูปเดิมได้

(a) สนามไฟฟ้า  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  สารละลายมี  $\sigma \ 10 \text{ mS.m}^{-1}$

(b) หลังจากให้สนามไฟฟ้า  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  ความถี่  $1 \text{ MHz}$  เป็นเวลา  $10$  นาที รอให้คืนรูปนาน  $5$  นาที ปรากฏว่า โพรโทพลาสต์ ไม่สามารถคืนสู่รูปเดิมได้

#### 4.4.4 ความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตก

การศึกษานี้เพื่อหาความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตกซึ่งเป็นความถี่ที่มีค่าต่ำกว่าความถี่ขอบต่ำของสเปกตรัมความถี่เล็กน้อย (ดูผลข้อ 4.3) โดยให้สภาพนำไฟฟ้าคงที่เป็น  $10 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$  เลือกสนามไฟฟ้า 4 ค่า ตามที่ทดลองข้างต้น ตาราง 7 แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มสนามไฟฟ้าสูงขึ้น ความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตกจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย ส่วนเวลาที่โพรโทพลาสต์ทนต่อแรงกระทำในสนามไฟฟ้าก่อนแตกนั้นขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้า กล่าวคือถ้าสภาพนำไฟฟ้าต่ำโพรโทพลาสต์จะทนต่อแรงกระทำได้นานกว่าในสภาพนำไฟฟ้าสูง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.3 กล่าวคือความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตกซึ่งอยู่ต่ำกว่าความถี่ขอบต่ำเล็กน้อยจะสูงขึ้นตามความเข้มสนามไฟฟ้า

ตาราง 7 ความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตกที่ความเข้มสนามไฟฟ้าต่างกัน  
เมื่อ  $\sigma_s 10 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$

E ( $\text{kV}\cdot\text{m}^{-1}$ )	ความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตก (kHz)	เวลาที่โพรโทพลาสต์อยู่ในสนาม ไฟฟ้า (s)
30	$12.67 \pm 2.65$	$31.67 \pm 5.83$
45	$21.67 \pm 3.00$	$38.33 \pm 2.92$
60	$154.67 \pm 11.04$	$15.00 \pm 5.00$
85	$293.33 \pm 11.55$	$15.33 \pm 4.53$

#### 4.5 การวิเคราะห์การยืดของโพรโทพลาสต์เทียบกับทฤษฎี

##### 4.5.1 ผลการหาค่าคงที่ของการยืดตัวของโพรโทพลาสต์ (elongation constant ; K)

จากการทดลองสามารถวัดสัดส่วนการยืดของโพรโทพลาสต์ (a/b) ได้ ซึ่งนำมาคำนวณหาค่า K จากสมการที่ (17) โดยเลือกค่า a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 3 นาทีซึ่งเป็นเวลาที่โพรโทพลาสต์มีสัดส่วนการยืดคงที่ เนื่องจากสมการดังกล่าวจำเป็นต้องทราบค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  ของโพรโทพลาสต์ขณะที่มีแรง DEP ชนิดบวกกระทำ แต่การทดลองศึกษาขณะที่โพรโทพลาสต์เกาะขั้วไฟฟ้าแล้ว อย่างไรก็ตามก็ตีหาค่าคงที่ทางไฟฟ้าที่วิเคราะห์โดยใช้ทฤษฎีแบบจำลองทรงกลมเปลือกเดี่ยว ซึ่ง สรวุฒิ (2541) ได้ประมาณไว้

เป็นจริงสำหรับกรณีนี้ด้วย (ตาราง 8) จะเห็นว่าค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  ของโพรโทพลาสต์ที่แขวนลอยในสารละลายที่มี  $\sigma_s$   $1 \text{ mS.m}^{-1}$  จะมีค่าสูงกว่าที่  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  ที่ความถี่ 0.5 MHz และ 1 MHz ส่วนที่ความถี่ 5 MHz และ 10 MHz ค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  ไม่แตกต่างกัน

ตาราง 8 ค่า  $\text{Re}(f(\omega))$  เมื่อเปลี่ยนความถี่และสภาพนำไฟฟ้า 2 ค่า

f (MHz)	Re[f( $\omega$ )]	
	$1 \text{ mS.m}^{-1}$	$20 \text{ mS.m}^{-1}$
0.5	0.0200	0.0146
1	0.0169	0.0152
5	0.0156	0.0155
10	0.0155	0.0155

ที่มา : สรวุฒิ (2541)

เมื่อแทนค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  จากตาราง 7 และ  $a/b$  ที่ทดลองได้ (ข้อ 4.4.2) ในสมการที่ 17 (บทที่ 2) จะสามารถคำนวณหาค่า  $K$  ได้ พบว่าแม้ความถี่และสนามไฟฟ้าจะทำให้โพรโทพลาสต์ยืด ( $a/b$ ) ไม่เท่ากันแต่ค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  ที่แต่ละความถี่จะทำให้ได้ค่า  $K$  ไม่ต่างกัน สำหรับที่สภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  ค่า  $K$  เฉลี่ยของ 135 โพรโทพลาสต์จาก 12 การทดลอง คือ  $0.035 \pm 0.009 \text{ mN.m}^{-1}$  ส่วนที่สภาพนำไฟฟ้า  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  ค่า  $K$  เฉลี่ยของ 117 โพรโทพลาสต์จาก 12 การทดลอง คือ  $0.038 \pm 0.007 \text{ mN.m}^{-1}$  ซึ่งรายละเอียดดูได้จากภาคผนวก 8

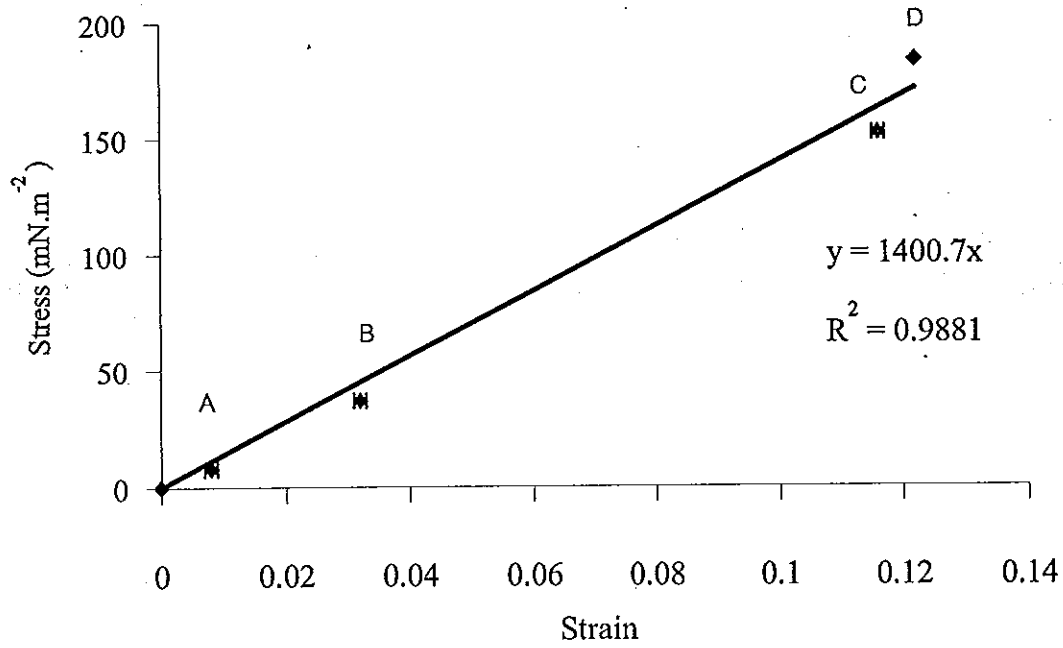
#### 4.5.2 การหาค่า Young's modulus ของโพรโทพลาสต์ (Young's modulus ; Y)

ในการหาค่า Young's modulus ของโพรโทพลาสต์ด้วยวิธีการวัดการยืดในสนามไฟฟ้านี้ทำได้โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น ( $F_k/\pi b^2$ ) กับความเครียด ( $\Delta a/a$ ) ในสมการที่ 17 (บทที่ 2) โดยค่า  $F_k$  คำนวณจากกฎของฮุก ( $F_k=2(\Delta a)K$ ) ซึ่งใช้ค่า  $K$  จากการศึกษาข้างต้น จะได้ความชันของกราฟคือค่า Young's modulus (ภาพประกอบ 27, 28) เมื่อหาค่าเฉลี่ยของความชันกราฟทุกชุดจะได้ค่า Young's modulus ของโพรโทพลาสต์เป็น  $1.38 \pm 0.15 \text{ N.m}^{-2}$

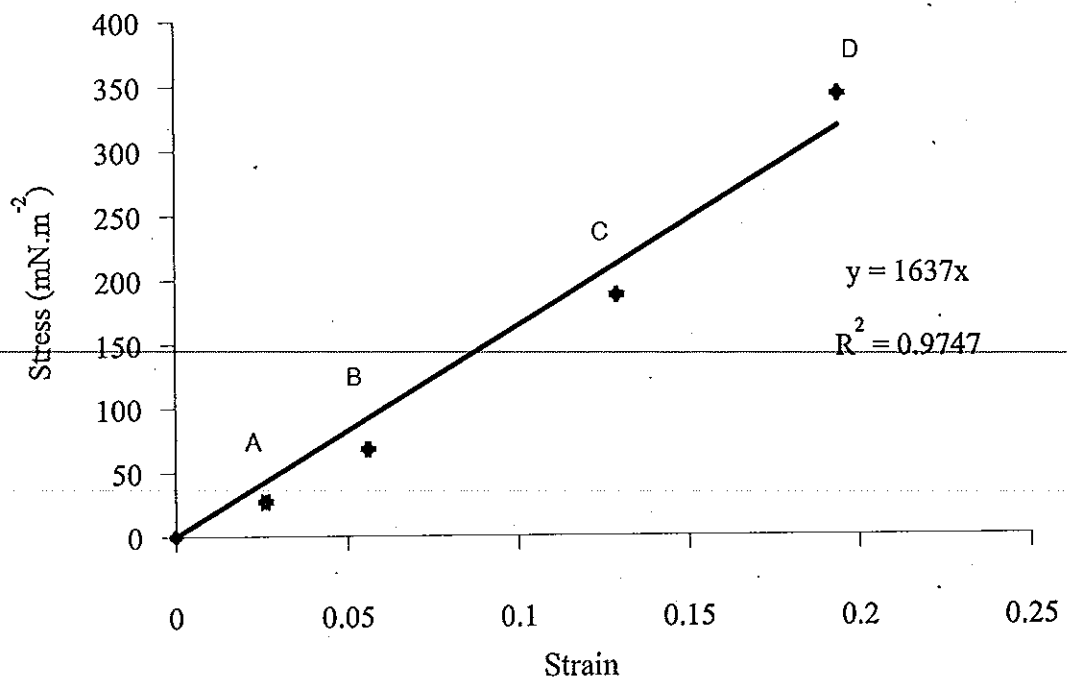
เพื่อศึกษาผลของความถี่ต่อความเค้นจึงเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นกับความถี่ (ภาพประกอบ 29) จะเห็นว่าสภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  และ  $20 \text{ mS.m}^{-1}$

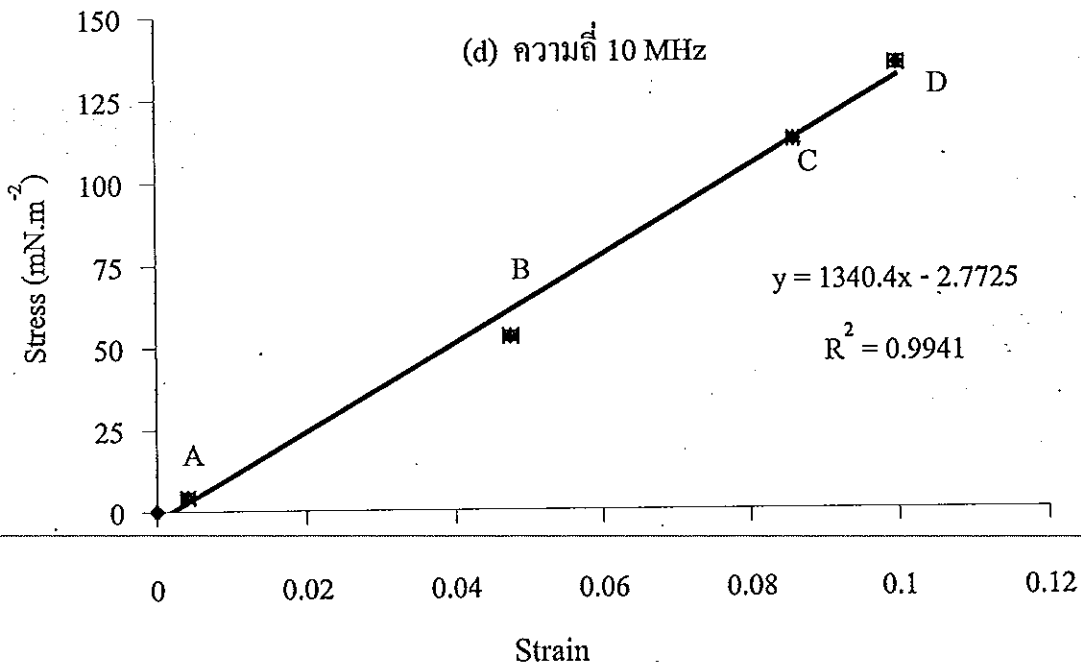
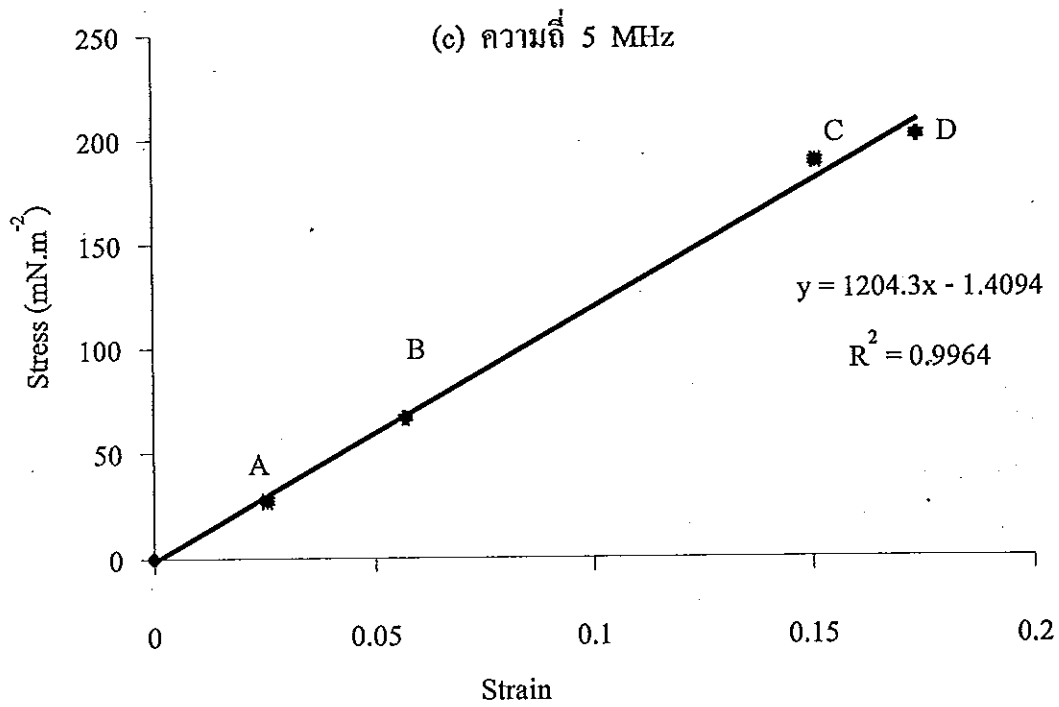
ความถี่จะมีผลต่อความเค้นตามขนาดของความเข้มสนามไฟฟ้า และการเพิ่มของความเค้นจะรวดเร็วที่สนามไฟฟ้าสูง โดยมีสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายเป็นตัวแปรด้วย กล่าวคือที่  $\sigma_r$  1 mS.m<sup>-1</sup> ความถี่ 1 MHz ทำให้เกิดความเค้นสูงสุดขนาด  $342.49 \pm 1.49$  mN.m<sup>-2</sup> ที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 85 kV.m<sup>-1</sup> ขณะที่  $\sigma_r$  20 mS.m<sup>-1</sup> ความถี่ 5 MHz ทำให้เกิดความเค้นสูงสุดขนาด  $242.74 \pm 1.02$  mN.m<sup>-2</sup> ที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 85 kV.m<sup>-1</sup> ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.4.1

(a) ความถี่ 0.5 MHz



(b) ความถี่ 1 MHz

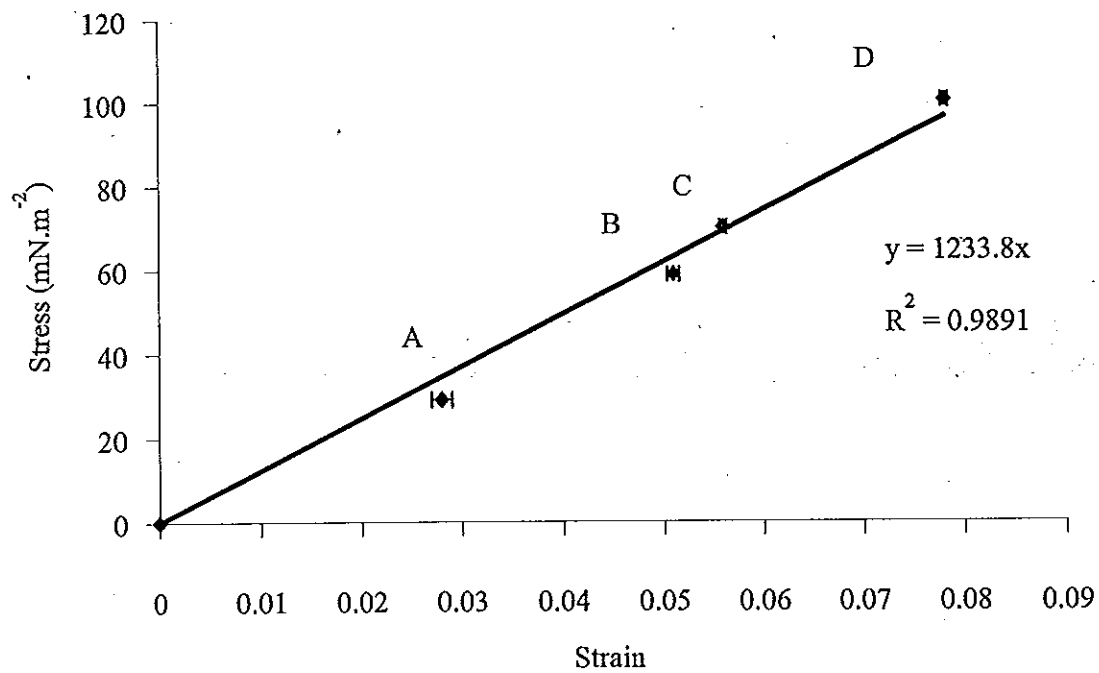




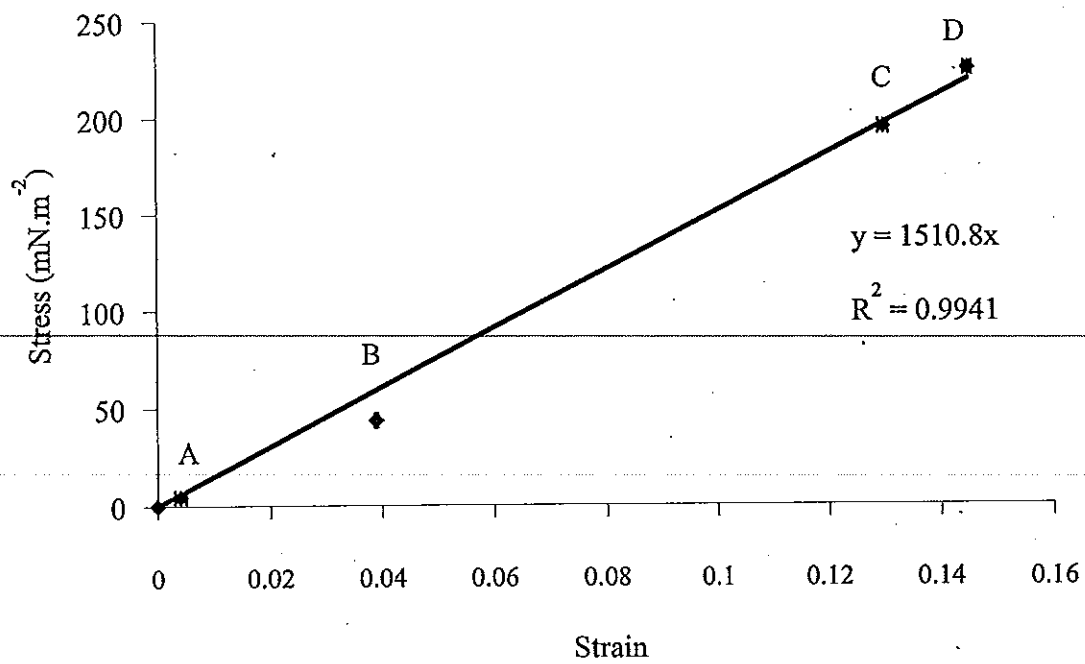
ภาพประกอบ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (stress) กับความเครียด (strain) A,B,C และ D แทนกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีขนาดเดียวกันแต่ได้จากการย่อยโพรโทพลาสต์ต่างชุดกัน เมื่อ  $\sigma_s = 1 \text{ mS.m}^{-1}$

(a) 0.5 MHz (b) 1 MHz (c) 5 MHz และ (d) 10 MHz

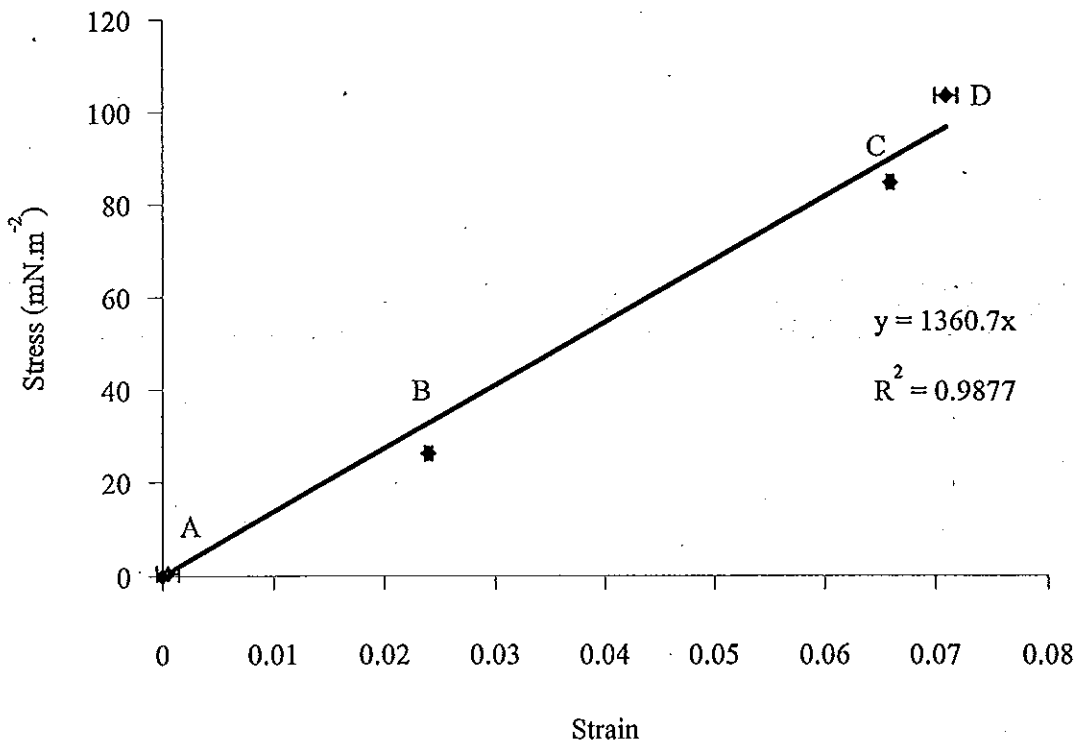
(a) ความถี่ 1 MHz



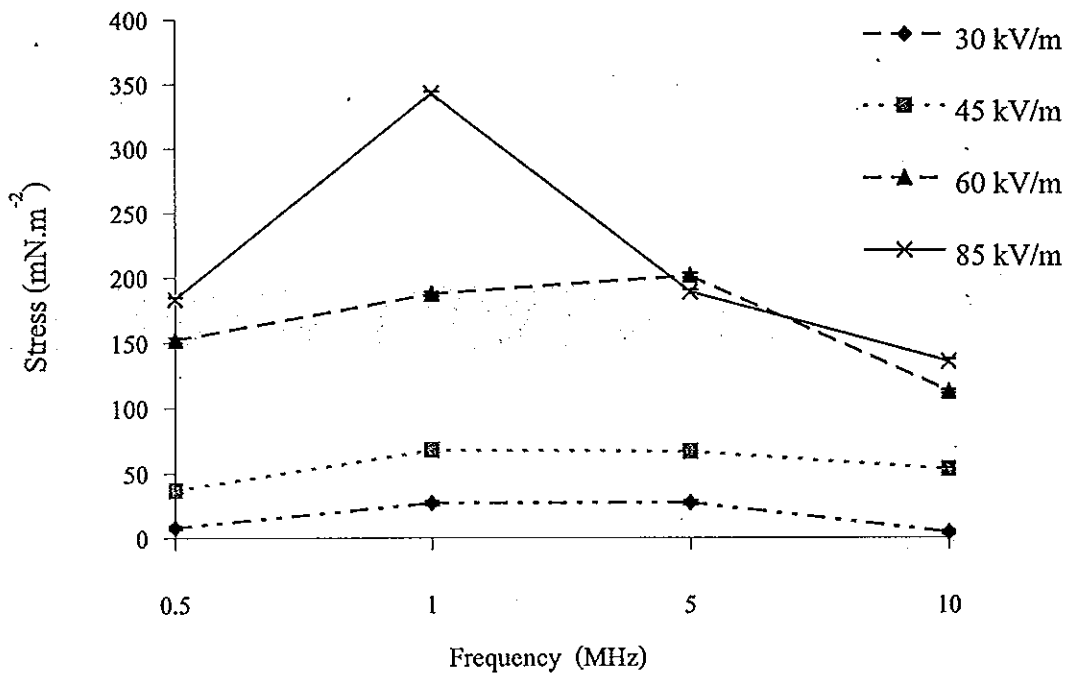
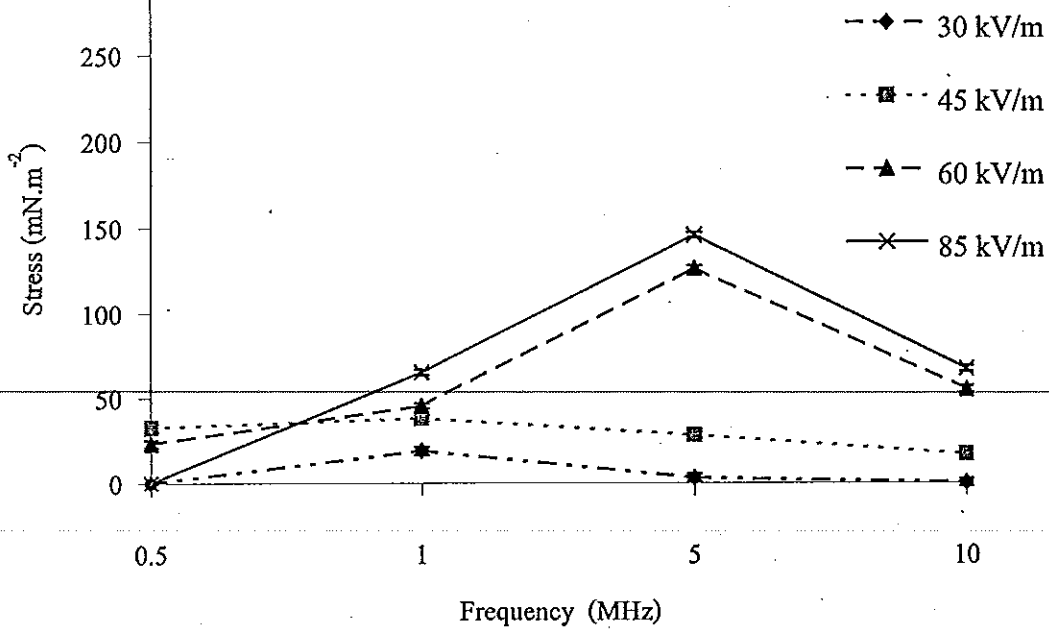
(b) ความถี่ 5 MHz



(c) ความถี่ 10 MHz



ภาพประกอบ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (stress) กับความเครียด (strain)  
A,B,C และ D แทนกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่มีขนาดเดียวกันแต่ได้  
จากการย่อยโพรโทพลาสต์ต่างชุดกัน เมื่อ  $\sigma_s$  20 mS.m<sup>-1</sup>  
(a) 1 MHz (b) 5 MHz และ (c) 10 MHz

(a)  $\sigma_s$  1 mS.m<sup>-1</sup>(b)  $\sigma_s$  20 mS.m<sup>-1</sup>

ภาพประกอบ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นกับความถี่ เมื่อให้โพรโทพลาสต์ อยู่ในสนามไฟฟ้าขนาด 3 นาที

#### 4.6 การดูดซึมฟอสเฟตของโพรโทพลาสต์หลังถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า

##### 4.6.1 ผลการดูดซึมสารรังสีของโพรโทพลาสต์หลังถูกเหนี่ยวนำ

จากการศึกษาจุดิพร (2541) พบว่าเมื่อให้เซลล์กลุ่มแพลงก์ตอนพืชน้ำเค็ม อยู่ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับช่วงความถี่ DEP เป็นระยะเวลาหนึ่ง เซลล์เติบโตกว่าปกติ Serpersu และ Tsong (1984) พบว่าสนามไฟฟ้ามีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เชื่อมุ้ม เซลล์ทำให้การดูดกลืนไอออนของเซลล์เพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้จึงต้องการตรวจสอบผลของสนามไฟฟ้าต่อโพรโทพลาสต์โดยใช้ข้อมูลการดูดซึมอาหารด้วยวิธีไอโซโทปรังสีแทนการศึกษาโดยอาศัยการแบ่งเซลล์ เนื่องจากในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ประมาณ 20 วัน และไม่สามารถติดตามการเพิ่มจำนวนโพรโทพลาสต์หลังเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าได้เนื่องจากมีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อน โดยให้โพรโทพลาสต์ที่แขวนลอยในสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  สภาพนำไฟฟ้า  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  เลือกศึกษาความเข้มสนามไฟฟ้า 3 ค่า คือ  $17 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  จากการศึกษาในข้อ 4.3.2 พบว่าสเปคตรัมความถี่ DEP ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ต่ำมีค่าใกล้ความถี่วิกฤติซึ่งทำให้โพรโทพลาสต์แตก การทดลองนี้จึงเลือกเฉพาะความถี่ 1 MHz เพื่อให้โพรโทพลาสต์เกาะขั้วไฟฟ้าและปล่อยให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้านาน 3 ช่วงเวลา คือ 1 นาที, 3 นาที และ 5 นาที เมื่อนำโพรโทพลาสต์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำที่ค่าสนามและเวลาต่างๆ กัน ตามวิธีดำเนินการข้อ 3.3.7 (บทที่ 3) แล้วสุ่มตัวอย่างเพื่อนับปริมาณรังสีในโพรโทพลาสต์ภายหลังเวลา 3 ชั่วโมง ผลการดูดซึมสารรังสีเทียบกับเวลาที่โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าได้แสดงในภาพประกอบ 30 จะเห็นว่าสนามไฟฟ้าขนาด  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  ทุกช่วงเวลาที่เหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์ การดูดซึมสารรังสีของโพรโทพลาสต์ไม่ต่างจากชุดควบคุมที่สนามไฟฟ้าขนาด  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  ที่เวลาของการเหนี่ยวนำ 1 นาที และ 3 นาที การดูดซึมสารรังสีของโพรโทพลาสต์ไม่ต่างจากชุดควบคุม แต่เมื่อให้เวลาในสนามไฟฟ้านาน 5 นาที อัตราการดูดซึมรังสีของโพรโทพลาสต์ลดลง ส่วนที่ความเข้มสนามไฟฟ้า  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  การดูดซึมสารรังสีของโพรโทพลาสต์ลดลงที่เวลาของการเหนี่ยวนำ 3 นาที และ 5 นาที เมื่อนำอัตรานับรังสีของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามไฟฟ้า นาน 5 นาที มาคำนวณฟลักซ์จากสมการที่ 31 (บทที่ 2) โดยสมมติว่าที่เวลาของการดูดซึมสารรังสี 3 ชั่วโมง ฟลักซ์ของโพรโทพลาสต์เข้าสู่ภาวะสมดุล ให้ทุกชุดมีความหนาแน่นโพรโทพลาสต์เท่ากันคือ  $1.83 \times 10^4$  per ml มีความแรงรังสีจำเพาะของสารละลายที่คิด

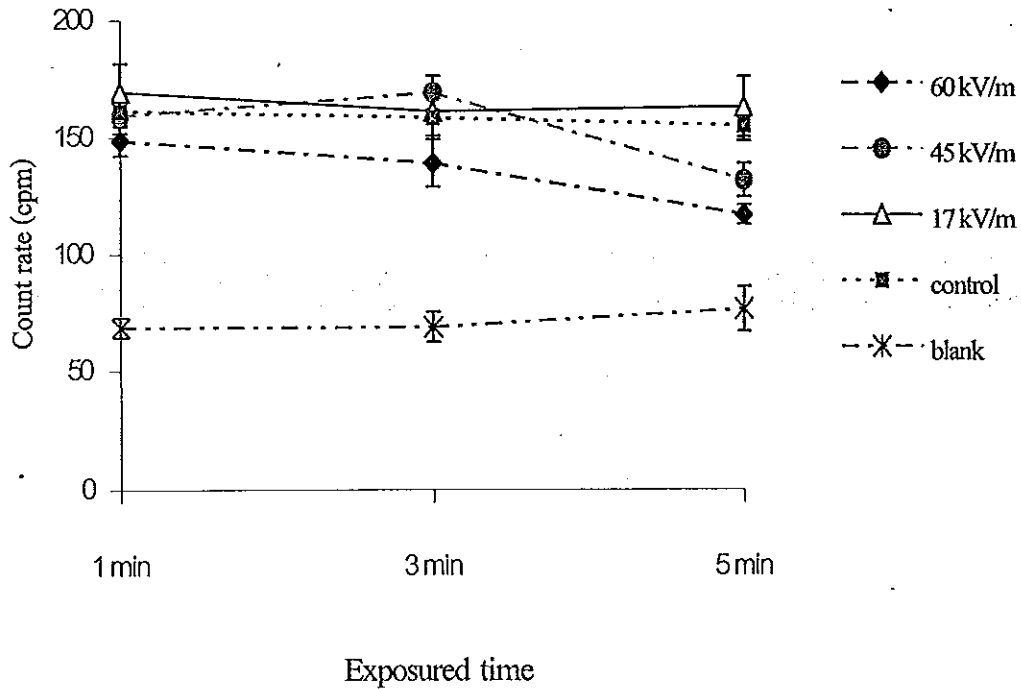
ฉลากรังสี ( $S_0$ ) เป็น  $9.31 \times 10^9$  cpm.mol<sup>-1</sup> (ภาคผนวก 4) และมีความแรงรังสีของบริเวณที่ทดลองเป็น 27.11 cpm ได้ผลตามตาราง 9 จะเห็นว่าที่สนามไฟฟ้า 60 kV.m<sup>-1</sup> ฟลักซ์ของโพโรโทพลาสติกน้อยกว่าชุดควบคุมประมาณ 0.7 เท่าของชุดควบคุม ที่สนามไฟฟ้า 45 kV.m<sup>-1</sup> ฟลักซ์ของโพโรโทพลาสติกน้อยกว่าชุดควบคุม 0.9 เท่าของชุดควบคุม และที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 17 kV.m<sup>-1</sup> ฟลักซ์ของโพโรโทพลาสติกไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

ตาราง 9 ฟลักซ์ของโพโรโทพลาสติกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าขนาด 5 นาที

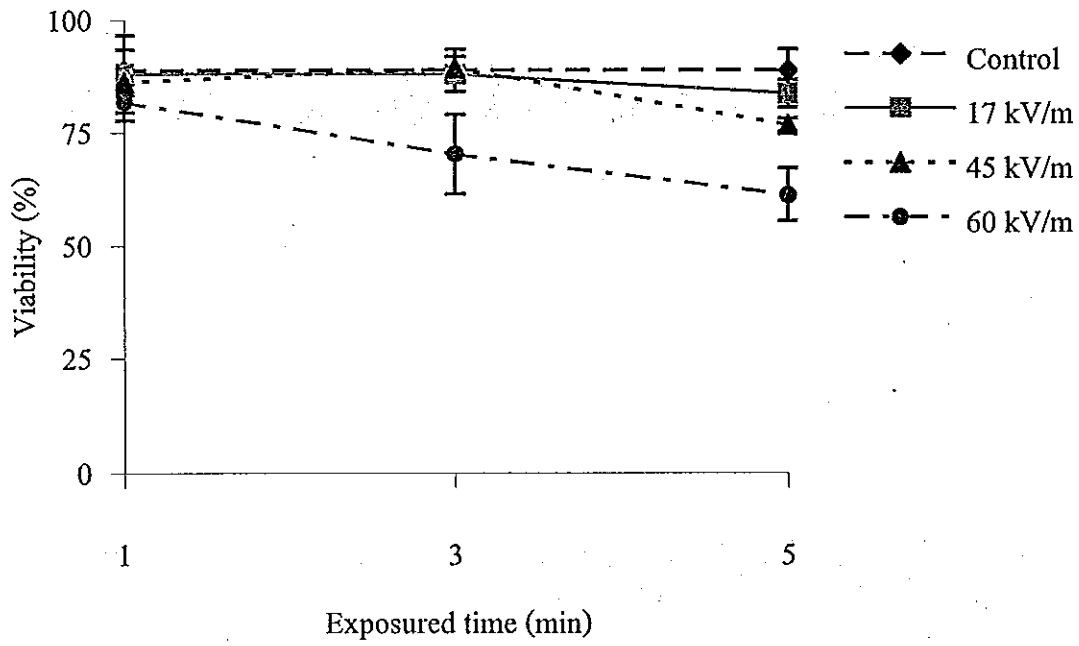
E (kV.m <sup>-1</sup> )	$\phi$ ( $\times 10^{12}$ mol.h <sup>-1</sup> .cell <sup>-1</sup> )
control	1.58 $\pm$ 0.06
17	1.63 $\pm$ 0.03
45	1.36 $\pm$ 0.07
60	1.17 $\pm$ 0.03

#### 4.6.2 ผลการตรวจสอบการมีชีวิตของโพโรโทพลาสติก

เมื่อเหนี่ยวนำโพโรโทพลาสติกในสนามไฟฟ้าแล้วเพื่อตรวจสอบว่าโพโรโทพลาสติกมีชีวิตอีกหรือไม่ จึงได้ทดสอบการมีชีวิตของโพโรโทพลาสติกด้วยสารเรืองแสง โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของโพโรโทพลาสติกกับเวลาในสนามไฟฟ้าดังแสดงในภาพประกอบ 30 จะเห็นว่าที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 17 kV.m<sup>-1</sup> เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของโพโรโทพลาสติกไม่ต่างจากชุดควบคุมทุกช่วงเวลาของการเหนี่ยวนำ ที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 45 kV.m<sup>-1</sup> และเวลาที่ให้โพโรโทพลาสติกอยู่ในสนามไฟฟ้า 1 นาที และ 3 นาที ไม่ต่างจากชุดควบคุม ส่วนที่เวลา 5 นาที เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าชุดควบคุม 0.9 เท่าของชุดควบคุม ส่วนที่ความเข้มสนามไฟฟ้าขนาด 60 kV.m<sup>-1</sup> ที่เวลาของการเหนี่ยวนำโพโรโทพลาสติก 3 นาที และ 5 นาที เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของโพโรโทพลาสติกลดลงและน้อยกว่าชุดควบคุมเป็น 0.8 เท่า และ 0.7 เท่า ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าสอดคล้องกับฟลักซ์ของโพโรโทพลาสติกในการทดลองข้างต้น



ภาพประกอบ 30 เปรียบเทียบอัตราการดูดซึม  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  (cpm) ของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ที่ผ่านการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที กับชุดควบคุม หลังจากการให้โพรโทพลาสต์ดูดซึมสารรังสีนาน 3 ชั่วโมง เมื่อ Blank คือ อัตรานับรังสีบนกระดาษกรองของสารละลายที่ไม่มีโพรโทพลาสต์แขวนลอย (Blackground เป็น 27.11 cpm)



ภาพประกอบ 31 ผลของเวลาในสนามไฟฟ้าต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. ที่อยู่ในสนามไฟฟ้าต่างๆ กัน

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผล

#### 5.1 ข้อวิจารณ์สารละลายเอนไซม์ผสมสำหรับแยกโพรโทพลาสต์และสารละลายสำหรับแขวนลอยโพรโทพลาสต์

ในการศึกษาสารละลายเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมสำหรับแยกโพรโทพลาสต์ออกจากใบกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.) ควรใช้ใบที่มีความยาวประมาณ 3-4 cm และส่วนของใบที่นำมาย่อยให้ห่างจากปลายใบ 0.5 cm โดยให้อัตราส่วนของเนื้อเยื่อใบต่อเอนไซม์ผสมเป็น 1:10 ได้สารละลายเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมสำหรับย่อยผนังเซลล์คือ Cellulase 2% Driselase 1% และ Marcerozyme 0.5% ซึ่งละลายในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอล  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  โดยมีค่า pH เป็น 5.7 เวลาที่เหมาะสมสำหรับย่อยคือ 4 ชั่วโมง หากใช้เวลานานกว่านี้จะมีโพรโทพลาสต์แตกมากขึ้น โพรโทพลาสต์ที่ได้มีขนาดเฉลี่ย  $50.22 \pm 2.04 \mu\text{m}$  แม้ว่า Cellulase มีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์เหมือน Driselase แต่การไม่มี Driselase ทำให้ผลการย่อยได้ไม่ดีเท่ากับการที่มี Driselase ผสม ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Price และ Earle (1984) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ที่ไม่มี Driselase ผสม ต้องใช้เวลาย่อยนานถึง 1 วัน

แม้ว่าแมนนิทอลเข้มข้น  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  จะเหมาะสมสำหรับเป็นตัวทำละลายของเอนไซม์ดังกล่าว แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับแขวนลอยโพรโทพลาสต์เมื่อต้องการศึกษาด้วยสนามไฟฟ้าคือ  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้มีเปอร์เซ็นต์ที่โพรโทพลาสต์คงรูปทรงกลมได้สูงสุด (87%) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น (ตาราง 3) ในระหว่างการทดลองด้วยสนามไฟฟ้า จะใช้เวลาไม่เกิน 3 ชั่วโมง แสดงว่าแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  มีความดันออสโมติกสมมูลกับความดันออสโมติกของโพรโทพลาสต์ในช่วงที่กำลังศึกษา ค่าความดันออสโมติกของโพรโทพลาสต์คำนวณจากความดันออสโมติกของสารละลาย ( $\Pi = CRT$ ; Hoppe, *et al.*, 1983) ที่อุณหภูมิ  $25^\circ\text{C}$  คือ 1.24 MPa ค่านี้อยู่ในช่วงความดันออสโมติกของเซลล์พืชทั่วไปคือ 0.4 MPa ถึง 1.5 MPa (ลัมพินธ์, 2526)

## 5.2 ข้อวิจารณ์สเปกตรัมไดอิเล็กโทรฟอเรติกของโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์

จากการศึกษาสเปกตรัมไดอิเล็กโทรฟอเรติกของโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์ พบว่าขอบเขตความถี่ต่ำของโพรโทพลาสต์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไฟฟ้าหรือเพิ่มสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย ทั้งนี้เป็นจริงทั้งการศึกษาในโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์ ดังสรุปผลเชิงเปรียบเทียบในตาราง 10 ได้ว่าที่  $\sigma_s$  1 mS.m<sup>-1</sup> เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไฟฟ้าจาก 17 kV.m<sup>-1</sup> ถึง 60 kV.m<sup>-1</sup> ขอบเขตความถี่ต่ำของโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์เพิ่มขึ้นจาก 3 kHz เป็น 155 kHz และ 5 kHz ถึง 215 kHz ตามลำดับ เมื่อเพิ่ม  $\sigma_s$  เป็น 10 mS.m<sup>-1</sup> ขอบเขตความถี่ต่ำของโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์เพิ่มขึ้นจาก 8 kHz เป็น 163 kHz และ 11 kHz ถึง 253 kHz ตามลำดับ และที่  $\sigma_s$  เป็น 20 mS.m<sup>-1</sup> ขอบเขตความถี่ต่ำของโพรโทพลาสต์เพิ่มขึ้นจาก 23 kHz เป็น 187 kHz ส่วนกลุ่มโพรโทพลาสต์เพิ่มขึ้นจาก 26 kHz ถึง 356 kHz

ขอบเขตความถี่ต่ำที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มของสภาพนำไฟฟ้า และความเข้มข้นไฟฟ้าที่พบในเซลล์ *Neurospora slime* และเซลล์ *Murine myeloma* (Gimsa, et al., 1991 และ Marszalek, et al., 1991) เม็ดเลือดแดงของคนและหนู (Mahaworasilpa, et al., 1994) สอดคล้องกับงานวิจัยนี้

ตาราง 10 เปรียบเทียบสเปกตรัมไดอิเล็กโทรฟอเรติกระหว่างโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์ความหนาแน่น  $(1.91 \pm 0.31) \times 10^4$  per ml

$\sigma_s$ (mS.m <sup>-1</sup> )	E (kV.m <sup>-1</sup> )	$f_1-f_2$	
		โพรโทพลาสต์	กลุ่มโพรโทพลาสต์
1	17	3.00±2.00 kHz – 15 MHz	5.33 ±2.00 kHz – 15 MHz
	45	20.00±5.00 kHz – 15 MHz	30.33±6.00 kHz – 15 MHz
	60	155.00±11.73 kHz – 15 MHz	215±12.33 kHz – 15 MHz
10	17	8.33±6.22 kHz – 15 MHz	10.67±4.04 kHz – 15 MHz
	45	26.67±7.64 kHz – 15 MHz	253.33±10.41 kHz – 15 MHz
	60	163.33±7.64 kHz – 15 MHz	25.67±5.67 kHz – 15 MHz

ตาราง 10 (ต่อ)

$\sigma_s$ (mS.m <sup>-1</sup> )	E (kV.m <sup>-1</sup> )	$f_1-f_2$	
		โพรโทพลาสต์	กลุ่มโพรโทพลาสต์
20	17	23.33±2.79 kHz – 15 MHz	125.33±10.63 kHz – 15 MHz
	45	60.00±10.00 kHz – 15 MHz	355.67±15.63 kHz – 15 MHz
	60	186.67±7.63 kHz – 15 MHz	355.67±15.63 kHz – 15 MHz

### 5.3 ข้อวิจารณ์การเปลี่ยนรูปของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้า

จากข้อสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์ ในการศึกษาลมเปดตรีบีโดอิเล็กโทรฟอเรติกของโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์ พบว่าสนามไฟฟ้าขนาด 17 kV.m<sup>-1</sup> ไม่ทำให้โพรโทพลาสต์เปลี่ยนรูปแต่หากใช้ความเข้มสนามไฟฟ้าขนาด 30 kV.m<sup>-1</sup> ขึ้นไป โพรโทพลาสต์จะยึดขณะที่เคลื่อนที่เกาะขั้วไฟฟ้า ส่วนกลุ่มโพรโทพลาสต์จะเกิดโซ่ก่อนเคลื่อนที่ดังกล่าว อย่างไรก็ตามที่ความเข้มสนามไฟฟ้า 30 kV.m<sup>-1</sup> ไม่สามารถมองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์ได้ง่ายนักแต่โดยวิธีวัดขนาดของโพรโทพลาสต์จึงทราบว่าโพรโทพลาสต์ยึดจากเดิม 2.32% (ช่วงความถี่ 0.5 MHz ถึง 10 MHz) Zimmermann และคณะ (1977) อธิบายการยึดของเซลล์ในสนามไฟฟ้าว่าความเข้มสนามไฟฟ้าจะทำให้ความต่างศักย์บนเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อแรงกดดันไฟฟ้าจึงทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปไป MacGinitie และคณะ (1987) อธิบายว่าการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์จะขึ้นกับขนาดของเซลล์ ดังนั้นจากการศึกษาการยึดของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ สรุปได้ว่าการยึดขึ้นกับความเข้มสนามไฟฟ้าและความถี่สัญญาณไฟฟ้า (Engelhardt and Sackmann, 1988 ; Gass, *et al.*, 1991 ; Poznanski, *et al.*, 1992 ; Pawlowski, *et al.*, 1993 ; Mahaworasilpa, 1992 ; Marszalek and Tsong, 1995 และ Krueger and Thom, 1997) กล่าวคือความถี่จะมีผลต่อการยึดของโพรโทพลาสต์อย่างชัดเจนถ้าโพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าที่สูงกว่า 45 kV.m<sup>-1</sup> การศึกษานี้พบว่าที่ 85 kV.m<sup>-1</sup> และ ความถี่ 1 MHz จะทำให้โพรโทพลาสต์ยึดมากที่สุด ( $a/b=1.46\pm 0.02$ ) แต่การเพิ่มสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย 1 mS.m<sup>-1</sup> เป็น 20 mS.m<sup>-1</sup> ความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์ยึดสูงสุดจะเพิ่มขึ้นเป็น 5 MHz ( $a/b=1.37\pm 0.01$ )

การยึดของโพรโทพลาสต์ที่ขึ้นกับความถี่นี้พบว่าที่  $\sigma_s$  หนึ่งๆ มีขนาด  $a/b$  สูงสุด ที่ความถี่เดียว ซึ่งเมื่อพิจารณาภาพประกอบ 29 จะเห็นว่าที่  $\sigma_s$   $1 \text{ mS.m}^{-1}$  การยึดสูงสุดที่ความถี่ 1 MHz และที่  $\sigma_s$   $20 \text{ mS.m}^{-1}$  การยึดสูงสุดที่ความถี่ 5 MHz ส่วนที่ความถี่ต่ำกว่าและสูงกว่านี้การยึดจะลดลง ลักษณะกราฟจึงเห็นเป็นยอดสูงสุดที่ความถี่ดังกล่าว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในโพรโทพลาสต์เม็ดเลือดแดงของคน โดย Mahaworasilpa (1992) พบว่าที่ความถี่ต่ำ (0.5 MHz) โพรโทพลาสต์ยึดได้มากและลดลงเมื่อความถี่เพิ่มขึ้น (ศึกษาช่วงความถี่ 0.5 MHz ถึง 2 MHz) แต่อย่างไรก็ดีไม่สามารถสรุปได้ว่าที่ความถี่ดังกล่าวมีการยึดสูงสุด เนื่องจากขนาดของแรงขึ้นกับค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  (สมการที่ 8 บทที่ 2) และที่  $\sigma_s$   $20 \text{ mS.m}^{-1}$  ขนาดของค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  มีค่าน้อยกว่าที่  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  (ตาราง 8) จึงเป็นเหตุผลอธิบายการยึดน้อยลงที่สภาพนำไฟฟ้าสูงขึ้น

นอกจากนี้พบว่าถ้าให้โพรโทพลาสต์ยึดเป็นเวลานานกว่า 10 นาที จะปรากฏสารบางชนิดที่เชื่อมุมโพรโทพลาสต์บริเวณด้านตรงข้ามกับผิวที่สัมผัสขั้วไฟฟ้า (ภาพประกอบ 25) ทั้งนี้อาจเกิดจากเชื่อมุมโพรโทพลาสต์บางลง ทำให้สารจากภายในรั่วออกมาได้ ซึ่งสอดคล้องกับการอธิบายของ Powlowski และ Fikus (1993) ว่าบริเวณดังกล่าวได้รับแรงกระทำสูงสุดและเมื่อแรงดันเพิ่มขึ้นจะทำให้ความหนาของเชื่อมุมเซลล์ลดลง

งานวิจัยนี้พบว่าโพรโทพลาสต์ยึดได้เต็มที่ในเวลา 2 นาที สำหรับทุกความเข้มข้นนำไฟฟ้าและความถี่ แต่ถ้าให้สภาพนำไฟฟ้าสูง ( $20 \text{ mS.m}^{-1}$ ) การยึดไม่สม่ำเสมอในช่วง 1.5 นาทีแรก (ภาพประกอบ 22-a) และเมื่อเพิ่มความถี่ให้สูงขึ้นการยึดของโพรโทพลาสต์จะมีความสม่ำเสมอขึ้น เนื่องจากความถี่ 0.5 MHz เป็นความถี่ใกล้เคียงขอบเขตต่ำของสเปกตรัมไดอิเล็กโทรฟอเรติก หากแรงกระทำต่อโพรโทพลาสต์เป็นผลจากอันตรกิริยาระหว่างไดโพลโมเมนต์กับสนามไฟฟ้าภายนอกตามที่ Pohl (1978) เสนอ จึงเป็นไปได้ว่าโพลาริเซชันภายในโพรโทพลาสต์ที่ความถี่นั้นๆ มีค่าต่ำ แรงที่กระทำจะต่ำด้วย กล่าวคือแรงนี้ใกล้ศูนย์ จะทำให้ศักย์ไฟฟ้าของโพรโทพลาสต์เปลี่ยนตามเวลา และ สรวุฒิ (2541) พบว่าค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  เพิ่มขึ้นไม่สม่ำเสมอที่สภาพนำไฟฟ้า  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  เช่นกัน เนื่องจากแรงขึ้นกับค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  แสดงว่าการยึดของโพรโทพลาสต์เกิดจากแรงที่กระทำต่อโพรโทพลาสต์ไม่สม่ำเสมอเช่นกัน

#### 5.4 ข้อวิจารณ์เวลาในการคืนรูปของโพรโทพลาสต์

งานวิจัยนี้ พบว่าเวลาในการคืนรูปของโพรโทพลาสต์คงที่ ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นสนามไฟฟ้า เมื่อให้โพรโทพลาสต์ยึดเต็มที่ในสนามไฟฟ้า ( $45 \text{ kV.m}^{-1}$  ถึง  $85 \text{ kV.m}^{-1}$ ) นาน 3 นาที และเมื่อเพิ่มเวลาในสนามไฟฟ้าถึง 20 นาที เวลาในการคืนรูปคงที่ ( $14.77 \pm 0.62 \text{ s}$ ) ในขณะที่เดียวกันพบว่าหากเหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้า นาน 1 นาที ซึ่งจากผลการทดลอง 4.4.2 ทราบว่าเป็นเวลาที่โพรโทพลาสต์ยังยึดไม่เต็มที่ จึงทำให้เวลาในการคืนรูปของโพรโทพลาสต์สั้นกว่า ( $10.06 \pm 0.15 \text{ s}$ ) และเมื่อเปรียบเทียบกับงานของ Mahaworasilpa (1992) พบว่าเวลาในการคืนรูปของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและหนูไม่ขึ้นกับความเข้มข้นสนามไฟฟ้าเช่นกัน

อย่างไรก็ดีหากสนามไฟฟ้ามีค่าสูงที่  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  และใช้สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายสูงด้วย ( $10 \text{ mS.m}^{-1}$  ในการทดลองนี้) และเหนี่ยวนำโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้า นาน 10 นาที โพรโทพลาสต์จะยึดเต็มที่แต่ไม่คืนรูป กล่าวคือเสียดสภาพการเป็นทรงกลมไป แสดงว่าโพรโทพลาสต์ที่ทดลองมีขีดจำกัดของการยึดหยุ่น ซึ่งอาจมีค่าต่างกันสำหรับโพรโทพลาสต์ต่างชนิดเช่นที่ Gass และคณะ (1991) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงจะคืนรูปเดิมได้เฉพาะกรณีความเข้มข้นสนามไฟฟ้าไม่เกิน  $400 \text{ kV.m}^{-1}$  ขณะเดียวกันการยึดของเซลล์จะเต็มที่เมื่อให้เวลาของการเหนี่ยวนำไม่เกิน 5 นาที

#### 5.5 ข้อวิจารณ์ความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์แตก

การที่โพรโทพลาสต์แตกเมื่อความถี่ของสนามไฟฟ้า ต่ำกว่าขอบเขตต่ำของสเปกตรัมไดโอดีเล็กโทรฟอเรติก เสมือนว่าศักย์ไฟฟ้าตรงตำแหน่งที่โพรโทพลาสต์แตกจะเกินขีดวิกฤติ มีการรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวกับศักย์วิกฤติ (Ho and Mittal, 1996) ซึ่งทำให้รูที่เยื่อหุ้มเซลล์เปิดออกและปิดได้ถ้าศักย์วิกฤติตรงตำแหน่งนั้นไม่เกิน  $1 \text{ V}$  ในกรณีที่โพรโทพลาสต์ที่ทดลองนี้แตกที่ความถี่ดังกล่าว แสดงว่าศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์ขณะนั้นน่าจะใกล้เคียงกันกับ  $1 \text{ V}$  บางงานวิจัยได้ใช้ประโยชน์จากการเกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อถ่ายโอนยีน (Sukharev, et al., 1992 และ Prausnitz, et al., 1995) และผลของยาต่อเซลล์ (Orlowski and Mir, 1993)

งานวิจัยนี้เมื่อให้สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายเป็น  $10 \text{ mS.m}^{-1}$  พบว่าความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. แตก อยู่ระหว่าง  $12.67 \pm 2.65 \text{ kHz}$  ถึง  $293.33 \pm 11.55 \text{ kHz}$

ที่สนามไฟฟ้าระหว่าง  $30 \text{ kV.m}^{-1}$  ถึง  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  Marszalek และคณะ (1990) ศึกษาเซลล์ *Murine myeloma* พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้า ความถี่ที่ทำให้เซลล์แตกจะเพิ่มขึ้น ด้วย ส่วน Pawlowski และคณะ (1993) พบว่าเซลล์รา *Neurospora crassa* แตกที่ความถี่ 70 Hz ถึง 300 kHz ซึ่งสอดคล้องกับที่พบในงานวิจัยนี้

#### 5.6 ข้อวิจารณ์ค่าคงที่ของการยืดหยุ่นและยังมอดุลัสของโพรโทพลาสต์

เมื่อนำสัดส่วนการยืด ( $a/b$ ) และค่าจริงของฟังก์ชันความถี่ที่ได้จากการประมาณค่าคงที่ทางไฟฟ้าของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. (สรวิฑู, 2541) มาหาค่าคงที่ของการยืดหยุ่น ( $K$  ; สมการที่ 17 บทที่ 2 ) เพื่อหาค่ายังมอดุลัส ( $Y$ ) จากความสัมพันธ์กราฟระหว่างความเค้นกับความเครียด ได้ว่า  $K$  มีค่าประมาณ  $0.037 \pm 0.011 \text{ mN.m}^{-1}$  และ  $Y$  มีค่าประมาณ  $1.38 \pm 0.15 \text{ N.m}^{-2}$  ซึ่งในตาราง 11 จะเปรียบเทียบค่า  $K$  และ  $Y$  ของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. กับเซลล์ชนิดอื่น

ตาราง 11 เปรียบเทียบค่า  $K$  และ  $Y$  ของโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp. กับเซลล์แต่ละชนิดจากงานวิจัยอื่น

ชนิดของเซลล์	$K$ ( $\text{mN.m}^{-1}$ )	$Y$ ( $\text{N.m}^{-2}$ )	ที่มา	หมายเหตุ
โพรโทพลาสต์ <i>Dendrobium</i> sp.	$0.037 \pm 0.011$	$1.38 \pm 0.15$	This work	
<i>Valonia</i> <i>utricularis</i>		$59 \times 10^5$ ถึง $96 \times 10^5$	Zimmermann, <i>et al.</i> , 1977	
ชั้นของไข่ม้วน 2 ชั้นและเยื่อหุ้ม เซลล์	0.2 - 2		Tien, 1968 ; Haydon, <i>et al.</i> , 1968 ; Wolfe, 1979 อ้าง จาก Mahaworasilpa, 1992	คิดจาก แรงดึง ผิว

ตาราง 11 (ต่อ)

ชนิดของเซลล์	K ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ )	Y ( $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ )	ที่มา	หมายเหตุ
Mouse myeloma		150	Mahaworasilpa, 1992	
Human erythroleukemia		120	Mahaworasilpa, 1992	
Plant cells		2-200	Dainty, <i>et al.</i> , 1974; Zimmermann and Steudle, 1974 อ้างจาก Mahaworasilpa, 1992	
Erythrocyte Cytoskeletal		$(2.0 \pm 0.1) \times 10^3$	Boal, 1994	ใช้แบบจำลอง
Erythrocyte	0.0074		Engelhardt, <i>et al.</i> , 1984	ที่อุณหภูมิ $30^\circ\text{C}$

ค่า K และ Y ที่ได้จากการศึกษานี้ต่างจากผลที่ได้จากเซลล์อื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะค่า K และ Y เป็นสมบัติเฉพาะของเซลล์แต่ละชนิด Poznanski และคณะ (1992) เสนอแนะว่า อาจเกิดจากความต่างกันของชั้นไขมันและโปรตีนที่เชื่อมเซลล์ ความตึงผิวและอันตรกิริยาของไซโทพลาสซึมที่บริเวณเชื่อมเซลล์กับโครงสร้างภายในเซลล์

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นกับความถี่ พบว่าความถี่มีผลต่อความเค้นอย่างชัดเจนถ้าความเข้มสนามไฟฟ้าสูง ( $60 \text{ kV}\cdot\text{m}^{-1}$  ถึง  $85 \text{ kV}\cdot\text{m}^{-1}$ ) และการเพิ่มสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายจะทำให้ความเค้นสูงสุดลดลง ผลทำนองเดียวกันนี้ดูได้จากงานของ

Engelhardt และ Sackmann (1988) และ Poznanski และคณะ (1992) ซึ่งได้เก็บข้อมูลที่ละเอียดกว่า และการเปลี่ยนแปลงความเค้นจะค่อยเป็นค่อยไปความเค้นสูงสุดจึงคงที่ ที่ความถี่ช่วงหนึ่ง ที่น่าสังเกตคือการขยับของความเค้นสูงสุดนี้ขึ้นกับสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายซึ่งเป็นไปทำนองเดียวกันกับค่า  $\text{Re}[f(\omega)]$  ที่สรูจ (2541) พบ งานวิจัยนี้พบว่าความเค้นสูงสุดผันแปรตามระยะขีดของโพรโทพลาสต์ที่สภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  ความเค้นสูงสุดมีค่า  $342.49 \pm 1.49 \text{ mN.m}^{-2}$  ที่ความถี่ 1 MHz และที่สภาพนำไฟฟ้า  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  ความเค้นสูงสุดคือ  $242.74 \pm 1.02 \text{ mN.m}^{-2}$  ที่ความถี่ 5 MHz

### 5.7 ข้อวิจารณ์การดูดซึมอาหารของโพรโทพลาสต์หลังถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า

ผลของสนามไฟฟ้ากระแสสลับต่อการดูดซึมฟอสเฟตของโพรโทพลาสต์กล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium* sp. นั้น ถ้าความเข้มสนามไฟฟ้า  $17 \text{ kV.m}^{-1}$  และเวลาที่โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้านานไม่เกิน 5 นาที อัตราการดูดซึมสารรังสีของโพรโทพลาสต์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่ถ้าสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเป็น  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  อัตราการดูดซึมสารรังสีลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  ให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้านาน 3 นาที และ 5 นาที พบว่าอัตราการดูดซึมสารรังสีลดลงมากยิ่งขึ้น เมื่อศึกษาการมีชีวิตของโพรโทพลาสต์โดยการใช้สารเรืองแสง FDA ภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน พบว่าถ้าให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้า  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  นาน 3 นาที เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเป็น 89% และถ้าให้สนามไฟฟ้า  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเป็น 70% ถ้าเพิ่มเวลาเป็น 5 นาที จะทำให้โพรโทพลาสต์ตายเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบการศึกษการดูดซึมฟอสเฟตและการมีชีวิตของโพรโทพลาสต์กับชุดควบคุมที่สนามไฟฟ้า  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  พบว่าอัตราการดูดซึมลดลง 26% ขณะที่อัตราการมีชีวิตลดลง 33% สาเหตุที่เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้อยกว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเล็กน้อย อาจเกิดจากการกระจายของโพรโทพลาสต์บนกระดาษกรองไม่สม่ำเสมอขณะหาอัตรานับทำให้อัตรานับหายไปบางส่วน

แม้ว่าสนามไฟฟ้าทั้งสองค่าคือ  $45 \text{ kV.m}^{-1}$  และ  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  จะทำให้โพรโทพลาสต์ยึดแล้วก็จับเป็นทรงกลมได้ปกติ แต่เนื่องจากความถี่ย่านวิทยุที่ใช้อยู่อาจทำให้สนามไฟฟ้าผ่านเข้าสู่ภายในโพรโทพลาสต์ได้ (ภาพประกอบ 1) จึงอาจส่งผลกระทบต่อกลไกภายในโพรโทพลาสต์ และมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ที่เยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์ตามที่ Deeley และคณะ (1979) เสนอ

## บทที่ 6

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### 6.1 สรุปผล

งานวิจัยนี้จะสรุปผลการศึกษาด้วยโพรโทพลาสต์ *Dendrobium* sp.

6.1.1 สารละลายเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมสำหรับย่อยผนังเซลล์ของใบกล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium* sp. ที่มีความยาวใบ 3-4 cm คือสารละลายเอนไซม์ผสมของ Cellulase 2% Driselase 1% และ Marcerozyme 0.5% ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 kmol.m<sup>-3</sup> มีค่า pH เป็น 5.7 โดยมีสัดส่วนของเนื้อเยื่อใบต่อสารละลายเอนไซม์เป็น 1:10 เวลาที่เหมาะสมสำหรับย่อยผนังเซลล์ คือ 4 ชั่วโมง โพรโทพลาสต์ที่ได้มีขนาดเฉลี่ย 50.22±2.04 μm เมื่อทดลองกับสนามไฟฟ้าควรใช้แมนนิทอล 0.5 kmol.m<sup>-3</sup> ซึ่งพบว่าทำให้โพรโทพลาสต์คงรูปทรงกลมได้มากที่สุดภายหลังจาก 24 ชั่วโมง ความดันออสโมติกที่ความเข้มข้นดังกล่าวสมดุลกับความดันออสโมติกภายในโพรโทพลาสต์ คือ 1.24 MPa

6.1.2 พฤติกรรมของโพรโทพลาสต์ในสนามไฟฟ้า พบว่าสเปกตรัมไดโพลีกรโพอเรติกของโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์มีขอบเขตความถี่สูงคือ 15 MHz ทุกๆ กรณีที่ศึกษาเนื่องจากเป็นขีดจำกัดของเครื่องมือทดลอง ส่วนที่ขอบเขตความถี่ต่ำจะเพิ่มขึ้นตามสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายหรือเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นสนามไฟฟ้า อย่างไรก็ตามความถี่ต่ำของกลุ่มโพรโทพลาสต์มีค่าสูงกว่าของเขตความถี่ต่ำของโพรโทพลาสต์ และพบว่าถ้าความเข้มข้นสนามไฟฟ้าขนาด 45 kV.m<sup>-1</sup> และ 60 kV.m<sup>-1</sup> ทั้งโพรโทพลาสต์และกลุ่มโพรโทพลาสต์ที่เป็นโฆจะยึดขณะที่เคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้า

6.1.3 ผลของสนามไฟฟ้าต่อการเปลี่ยนรูปโพรโทพลาสต์มีความยืดหยุ่นตามกฎของฮุก โดยมีเวลาที่ทำให้โพรโทพลาสต์ยืดสูงสุดคงที่คือประมาณ 2 นาที และไม่ขึ้นกับความเข้มข้นสนามไฟฟ้า สังเกตได้จากการทดลองนี้ว่าหากใช้ความถี่ต่ำ (0.5 MHz) และใช้สภาพนำไฟฟ้าสูง (20 mS.m<sup>-1</sup>) การยึดมี 2 จังหวะ ทั้งนี้เป็นจริงในทุกค่าสนามไฟฟ้าที่ทดลอง อย่างไรก็ตามการยึด (a/b) ของโพรโทพลาสต์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นสนามไฟฟ้า ส่วนความถี่จะมีผลต่อการยึดอย่างชัดเจนเมื่อใช้ความเข้มข้นสนามไฟฟ้าสูงกว่า 45 kV.m<sup>-1</sup> นอกจากนี้ถ้าใช้สนามไฟฟ้าที่มีความเข้มข้น 85 kV.m<sup>-1</sup> และใช้สารละลายที่มีสภาพนำ

ไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$  โพรโทพลาสต์จะยึดได้มากที่สุด ( $a/b=1.46\pm 0.02$ ) ที่ความถี่ 1 MHz หากเมื่อเพิ่มสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายเป็น  $20 \text{ mS.m}^{-1}$  ความถี่ที่ทำให้โพรโทพลาสต์ยึดได้สูงสุด ( $a/b=1.37\pm 0.01$ ) จะเพิ่มขึ้นเป็น 5 MHz ในทำนองเดียวกันจะพบว่าระยะยึดสูงสุดดังกล่าวทั้ง 2 กรณี จะมีความเค้นสูงสุดด้วย คือมีความเค้นสูงสุด  $342.49\pm 1.49 \text{ mN.m}^{-2}$  ที่ความถี่ 1 MHz และ  $242.74\pm 1.02 \text{ mN.m}^{-2}$  ที่ความถี่ 5 MHz

ส่วนเวลาในการคืนรูปจะคงที่ ( $14.77\pm 0.62 \text{ s}$ ) ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นไฟฟ้า การเพิ่มเวลาจาก 3 นาที ถึง 20 นาที ไม่มีผลต่อการคืนรูป แต่เมื่อให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าเป็นเวลา 1 นาที เวลาในการคืนรูปจะสั้นกว่า ( $10.06\pm 0.15 \text{ s}$ ) คาดว่าอาจเกิดจากการที่โพรโทพลาสต์ยังยึดได้ไม่เต็มที่เมื่อหยุดให้สนามไฟฟ้าการคืนรูปจึงใช้เวลาน้อยกว่า

เป็นที่สังเกตว่าหากโพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้า  $85 \text{ kV.m}^{-1}$  สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายสูง ( $10 \text{ mS.m}^{-1}$ ) นานเกิน 5 นาที โพรโทพลาสต์จะไม่คืนรูป บางกรณีเมื่อโพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้านานเกินไปอาจทำให้ศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์ที่ถูกเหนี่ยวนำเพิ่มถึงจุดวิกฤติทำให้เกิดการรั่วของสารบางชนิดจากภายในและบางครั้งจะเสียดสภาพการยึดหยุ่น หรือแตกได้ ถ้าใช้ความถี่ต่ำกว่าความถี่ขอบต่ำของสเปกตรัมไดอิเล็กโตรฟอเรติก

6.1.4 ค่าคงที่ของการยึดหยุ่น (K) และค่ายังมอดูลัส (Y) ของโพรโทพลาสต์ อาศัยทฤษฎีทรงกลมเปลือกเดียว พบว่าทุกค่าสนามไฟฟ้า ทุกค่าความถี่และสภาพนำไฟฟ้าทั้ง 2 ค่า ที่ศึกษา ทำให้ค่า K และ Y มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงจึงหาค่าเฉลี่ยสำหรับ 250 โพรโทพลาสต์ ได้ค่า K ประมาณ  $0.037\pm 0.011 \text{ mN.m}^{-1}$  และค่า Y ประมาณ  $1.38\pm 0.15 \text{ N.m}^{-2}$

6.1.5 ผลของสนามไฟฟ้าต่อการดูดซึมฟอสเฟต การวิจัยนี้ใช้สนามไฟฟ้าขนาด 17  $\text{kV.m}^{-1}$ , 45  $\text{kV.m}^{-1}$  และ 60  $\text{kV.m}^{-1}$  พบว่าถ้าโพรโทพลาสต์ถูกเหนี่ยวนำในสนามไฟฟ้าขนาด 17  $\text{kV.m}^{-1}$  นาน 3 นาที การดูดซึมฟอสเฟตไม่ต่างจากชุดควบคุม แต่ลดลงเมื่อความเข้มข้นสนามไฟฟ้าเป็น 45  $\text{kV.m}^{-1}$  และ 60  $\text{kV.m}^{-1}$  เมื่อตรวจสอบการมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ด้วยสารเรืองแสง FDA พบว่าเมื่อให้โพรโทพลาสต์อยู่ในสนามไฟฟ้าขนาด 45  $\text{kV.m}^{-1}$  และ 60  $\text{kV.m}^{-1}$  นาน 3 นาที เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเป็น 89% และ 70% ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ลดลงเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้านานขึ้น แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นสนามไฟฟ้าสูงและเวลาที่ให้เซลล์อยู่ในสนามไฟฟ้านานเกินไปจะทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทพลาสต์เกิดขึ้นได้สูง จึงสรุปว่าการดูดซึมฟอสเฟตที่ลดลงในสนามไฟฟ้าและ

เวลาของการเหนียวนำสูงเกิดจากโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตลดจำนวนลง

งานวิจัยนี้ให้ข้อคิดว่าหากจะใช้สนามไฟฟ้ากระแสสลับศึกษาโพรโทพลาสต์กล้วยไม้ *Dendrobium* sp. ควรคำนึงถึงความเข้มสนามไฟฟ้า ระยะเวลา และความถี่ของสัญญาณที่ใช้ ค่าคงที่ของการยืดหยุ่นและค่าขั้วมอดูลัสอาจเป็นข้อมูลพื้นฐานทางไฟฟ้าของโพรโทพลาสต์ชนิดนี้ได้ และอาจนำไปใช้ในการบอกความผิดปกติของเซลล์ นอกจากนี้ อาจเป็นประโยชน์ในการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ การรวมเซลล์ และการทำให้เซลล์แตกตัว

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าถ้าจะนำวิธีทางไฟฟ้าในการศึกษาเกี่ยวกับการรวมเซลล์ (Bakker, et al., 1993 และ Zimmermann, 1982 ) หรือการทำให้รูบนเยื่อหุ้มเซลล์เปิด (Ho and Mittal, 1996 และ DeBruin and Krassowska, 1999) ความเข้มสนามไฟฟ้าและเวลาในการทำงานกับโพรโทพลาสต์ในสนามดังกล่าวไม่ควรเกิน 3 นาที ส่วนความถี่ไม่ควรต่ำกว่าความถี่ชอบต่ำของสเปกตรัมโคอีเล็กโทรฟอเรติก

6.2.2 ค่าคงที่ K และ Y ที่ประมาณได้ จากการวิจัยนี้เป็นค่าเฉพาะสำหรับโพรโทพลาสต์ที่มีขนาด 50  $\mu\text{m}$  เพราะโพรโทพลาสต์ที่มีอายุมากกว่าหรือน้อยกว่าอาจมีค่า K และ Y เปลี่ยนไป ค่าคลาดเคลื่อนของการทดลองบอถึงความต่างกันของโพรโทพลาสต์ซึ่งแม้ว่าจะเลือกโพรโทพลาสต์ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ดีในการเลือกใบมาแยกโพรโทพลาสต์แต่ละครั้ง ควรเลือกใบที่มีขนาดหรืออายุใกล้เคียงกันเพื่อลดปัญหาเรื่องความแปรปรวนของข้อมูล และค่า K และ Y ที่ประมาณได้อาจมีจุดอ่อนเนื่องจากค่าจริงของฟังก์ชันความถี่ที่ใช้มาจากการทดลองที่โพรโทพลาสต์ไม่เปลี่ยนรูป (สรวิชาติ, 2541) เป็นไปได้ว่าขณะที่โพรโทพลาสต์ยืดค่าคงที่ทางไฟฟ้าอาจเปลี่ยนแปลงไปบ้าง เช่นสภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม สภาพนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์ และความหนาของเยื่อหุ้มโพรโทพลาสต์ ซึ่ง Powlowski และ Fikus (1993) เสนอว่าเมื่อให้แรงดันเพิ่มขึ้นจะทำให้ความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์จะลดลง

6.2.3 ค่ามอดูลัสที่ประมาณได้จะเหมาะสมสำหรับที่อุณหภูมิ 25°C เท่านั้น เนื่องจาก Zimmermann (1977) เสนอว่าค่ามอดูลัสจะเพิ่มถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้น

6.2.4 ในงานวิจัยนี้มีข้อจำกัดของเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า ซึ่งให้ศักย์สูงสุดเพียง

10 V จึงไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นไฟฟ้าเพื่อหาการยึดสูงสุดของโพรโทพลาสต์ได้ และไม่มีโอกาสที่จะศึกษาการแตกตัวของเซลล์ (cell fission) ได้ตามที่ Marszalek และ Tsong (1995) ศึกษา

6.2.5 การศึกษาโดยใช้วิธีไอโซโทปรังสี เป็นอีกวิธีที่สามารถใช้ตรวจสอบผลของสนามไฟฟ้าต่อโพรโทพลาสต์ในแง่ของการดูดซึมอาหาร ซึ่งอาจส่งผลต่อเนื่องถึงการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการนี้ไม่มีระบบปลอดเชื้อจึงไม่สามารถติดตามผลการเจริญเติบโตได้ มีข้อสังเกตว่าการที่โพรโทพลาสต์ดูดซึมฟอสเฟตได้น้อยลงที่สนามไฟฟ้าสูงๆ อาจเกิดจากการที่มีจำนวนโพรโทพลาสต์ตายเพิ่มขึ้น

หากสามารถวัดอัตราการเคลื่อนที่ของไอออนในขณะที่โพรโทพลาสต์ยึดอาจช่วยให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับผลกระทบของไฟฟ้าได้ละเอียดขึ้น

## บรรณานุกรม

คำคุณ กาญจนภูมิ. 2537. เทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ของพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จตุพร สุคศิริ. 2541. “ความถี่สัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับที่เหมาะสมต่อการคัดแยกแพลงก์ตอนพืชน้ำเค็ม 5 ชนิด (AC Field Frequencies for Isolation Five Marine Phytoplankton Species)”, วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา)

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

สมพงษ์ ใจดี. 2541. ฟิสิกส์ มหาวิทยาลัย 2. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สรุวุฒิ บุญฉวี. 2541. “การประมาณตัวแปรไดอิเล็กทริกสำหรับเซลล์เดี่ยวพืชด้วยวิธีไดอิเล็กโตรฟอเรติก (Estimations of Dielectric Parameters for Single Plant Cells Using Dielectrophoretic Method)”, วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา)

สัมพันธ์ คัมภีรานนท์. 2526. หลักสรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวรรณ ยุกแมน. 2540. “กล้วยไม้ตัดดอกของประเทศไทย”, ว. กล้วยไม้ไทย, 108-110.

Aramrattana P. and Scott B. I. H. 1987. “Potassium Flux Studies in Intact Portions of the Roots of *Oryza sativa*”, Aust. J. Plant Physiol. 14(1987), 91-115.

Bakker T. C., Kraan Y. M., Barlag W., Leij L. D., Grooth B. G. de and Greve. 1993.

“Selective Electrofusion of Conjugated Cells in Flow”, Biophys. J.  
65(1993), 568-572.

Boal D. H. 1994. “Computer Simulation of Model Network for the Erythrocyte

Cytoskeleton”, Biophys. J. 67(1994), 521-529.

Cereijido M. and Rotunno C. A. 1970. Introduction to the Study of Biological

Membranes. New York : Gordon and Breach Science.

Chernomordik L. V., Sokolov A. V. and Budker V. G. 1990. “Electrostimulated

Uptake of DNA by Liposomes”, Biochimica et Biophysica Acta. 1024  
(1990), 179-183.

Chu G., Hayakawa H. and Berg P. 1987. “Electroporation for the Transfection of

Mammalian Cells with DNA”, Nucleic Acids Research. 15(1987),  
1311-1326.

Cogalniceanu G., Radu M., Fologea D., Moisoi N. and Brezeanu A. 1998.

“Stimulation of Tobacco Shoot Regeneration by Alternating Weak Electric  
Field”, Bioelectrochemistry and Bioenergetics J. 44(1998), 257-260.

DeBruin K. A. and Krassowska W. 1999. “Modeling Electroporation in a Single

Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential”, Biophys. J.  
77(1999), 1213-1224.

Deeley J. O. T., Crum L. A. and Coakley W. T. 1979. “The Influence of

Temperature and Incubation Time on Deformability of Human

Erythrocytes", Biochimica et Biophysica Acta. 554(1979), 90-101.

Defelice Louis J. 1997. Electrical Properties of Cells Patch Clamp for Biologists.

New York : Plenum press.

Dimitrov D. S. and Sowers A. E. 1990. "Membrane Electroporation – Fast Molecular Exchange by Electroosmosis", Biochimica et Biophysica Acta. 1022 (1990), 381-392.

Engelhardt H. and Sackmann E. 1988. "On the Measurement of Shear Elastic Moduli and Viscosities of Erythrocyte Plasma Membranes by Transient Deformation in High Frequency Electric Fields", Biophys. J. 54(1988), 459-508.

\_\_\_\_\_. Gaub H. and Sackmann E. 1984. "Viscoelastic Properties of Erythrocyte Membranes in High Frequency Electric Fields", Nature. 307(1984), 378-380.

Gass G. V. and Chernomordik L. V. 1990. "Reversible Large-Scale Deformations in the Membranes of Electrically-Treated Cells : Electroinduced Bleb Formation", Biochimica et Biophysica Acta. 1023(1990), 1-11.

Gass G. V., Chernomordik L. V. and Margolis L. B. 1991. "Local Deformation of Human Red Blood Cells in High Frequency Electric Field", Biochimica et Biophysica acta. 1093(1991), 162-167.

Gimsa J., Marszalek P., Loewe U. and Tsong T. Y., 1991. "Dielectrophoresis and Electrorotation of Neurospora Slime and Murine Myeloma Cells",

Biophys. J. 60(1991), 749-760.

Hallett F. Ross, Marsh Jackie, Nickel Bernie G. and Wood Janet M. 1993.

“Mechanical Properties of Vesicle. II. A Model for Osmotic Swelling and Lysis”, Biophys. J. 64(1993), 435-442.

Harbich W. and Helfrich W. 1979. “Alignment and Opening of Giant Lecitin Vesicles by Electric Fields”, Z. Natureforsch. 349(1979), 1063-1065.

Ho S. Y. and Mittal G. S. 1996. “Electroporation of Cell Membrane : A Review”, Critical Reviews in Biotechnology. 16 : 4(1996), 349-362.

Hoppe W., Lohmann W., Markl H. and Ziegler H. 1983. “Linear Irreversible Thermodynamics”, Biophysics. pp. 337-341. New York : Springer-Verlag.

Johnson R. M. 1994. “Membrane Stress Increases Cation Permeability in Red Cells”, Biophys. J. 67(1994), 1876-1881.

Kaler K. V. I. S. and Jones T. B. 1990. “Dielectrophoretic Spectra of Single Cells Determined by Feedback-Controlled Levitation”, Biophysics. J. 57(1990), 173-182.

Klenchin V. A., Sukharev S. I., Serov S. M., Chernomordik L. V. and Chizmadzhev Y. A. 1991. “Electrically Induced DNA Uptake by Cells is a Fast Process Involving DNA Electrophoresis”, Biophys. J. 60(1991), 804-811.

Krueger M. and Thom F. 1997. “Deformability and Stability of Erythrocytes in High-Frequency Electric Fields Down to Subzero Temperatures”,

Biophys. J. 73(1997), 2653-2666.

MacGinitie L. A., Grodzinsky A. J., Frank E. H. and Gluzband Y. A. "Frequency and Amplitude Dependence of Electric Field Interactions : Electrokinetics and Biosynthesis" In : Mechanistic Approaches to Interactions of Electric and Electromagnetic Fields with Living Systems., Blank M. and Findl E. 1987. New York : Plenum Press.

Mahaworasilpa T. L. 1992. "Cell Electro-Dynamics : The Mechanics of Living Cells in Intense Alternating Electric Fields", Ph.D. Dissertation Faculty of Science, University of New South Wales.

Mahaworasilpa T. L., Coster G. L. and George E. 1994. "Force on Biological Cells due to Applied Alternating (AC) Electrical Field (i) Dielectrophoresis", Biophysica Acta. 1193(1994), 118-126.

Marszalek P. and Tsong T. Y. 1995. "Cell Fission and Formation of Mini Cell Bodies by High Frequency Alternating Electric Field", Biophys. J. 68(1995), 1218-1221.

---

\_\_\_\_\_. Liu D.-S and Tsong T. Y. 1990. "Schwan Equation and Transmembrane Potential Induced by Alternating Electric Field", Biophys. J. 58(1990), 1053-1058.

\_\_\_\_\_. Zielinsky J. J., Fikus M. and Tsong Tian Y. 1991. "Determination of Electric Parameters of Cell Membranes by a Dielectrophoresis Method", Biophys. J. 59(1991), 982-987.

Muraji M., Asai t. and Tatebe W. 1998. "Primary Root Growth Rate of *Zea mays* Seedlings Grown in An Alternating Magnetic Field of Different Frequencies.", Bioelectrochemistry and Bioenergetics. 44(1998), 271-273.

Nakanishi K., Tokuda H., Soga T. and Takeda M. 1998. "Effect of Electric Current on Growth and Alcohol Production by Yeast Cells", J. of Fermentation and Bioengineering. 85 : 2(1998), 250-253.

Nash G. B. and Meiselman. 1983. "Red Cell and Ghost Viscoelasticity Effect of Hemoglobin Concentration and In Vivo Aging", Biophys. J. 43(1983), 63-73.

Orlowski S. and Mir L. M. 1993. "Cell Electroporation : a New Tool for Biochemical and Pharmacological Studies", Biochimica et Biophysica Acta. 1154(1993), 51-63.

Palaniappan S., Sastry S. and Richter E. R. 1990. "Effects of Electricity on Microorganisms : A review", J. of Food Processing and Preservation. 14(1990), 393-414.

Pawłowski P. and Fikus M. 1993. "Bioelectrorheological Model of the Cell. 4. Analysis of the Extensile Deformation of Cellular Membrane in Alternating Electric Field", Biophys. J. 65(1993), 535-540.

Pawłowski P., Szutowicz I., Marszałek P. and Fikus M. 1993. "Bioelectrorheological Model of the Cell. 5. Electrodestruction of Cellular Membrane in Alternating Electric Field", Biophys. J. 65(1993), 541-549.

Pfafferoth C., Nash G. B. and Meiselman H. J. 1985. "Red Blood Cell Deformation in Shear Flow Effects of Internal and Phase Viscosity and of In Vivo Aging", Biophys. J. 47(1985), 695-704.

Pohl A. 1978. Dielectrophoresis. London : Cambridge University.

Poznanski J., Pawlowski P. and Fikus M. 1992. "Bioelectrorheological Model of the Cell 3. Viscoelastic Shear Deformation of the Membrane", Biophys. J. 61(1992), 612-620.

Prausnitz M. R., Corbett J. D., Gimm J. A., Golan D. E., Langer R. and Weaver J. C. 1995. "Millisecond Measurement of Transport During and After an Electroporation Pulse", Biophys. J. 68(1995), 1864-1870.

Price G. R. and Earle E. D. 1984. "Sources of Orchid Protoplasts for fusion Experiments", American Orchid Society Bulletin. 53 : 10(1984), 1035-1043.

Robert D. Dyson. 1978. Cell Biology A Molecular Approach. 2d ed. Boston : Allyn and Bacon.

---

Schwan H. P. 1988. "Dielectric Spectroscopy and Electro-Rotation of Biological Cells", Ferroelectrics. J. 86(1988), 205-223.

Serpescu E. H. and Tsong T. Y. 1984. "Activation of Electrogenic  $Rb^+$  Transport of (Na, K)-ATPase by an Electric Field", J. Biol. Chem. 259(1984), 7155-7162.

- Sukharev S. I., Klenchin V. A., Serov S. M., Chernomordik L. V. and Chizmadzhev Y. A. 1992. "Electroporation and Electrophoretic DNA Transfer into Cells : The Effect of DNA Interaction with Electropores", Biophys. J. 63(1992), 1320-1327.
- Suttle C. A. and Harrison P. J. 1988. "Ammonium and Phosphate Uptake Rates, N : P Supply Ratios and Evidence for N and P Limitation in Some Oligotrophic Lakes", Limnol. Oceanogr. 33(2), 186-202.
- Vacin E. F. and Went F. 1949. "Some pH changes in nutrient solutions", pp. 589-599. In C. L. Withner (ed.), *The Orchids, Survey*. Ronald Press. N. Y.
- Waugh R. E. 1987. "Effects of Inherited Membrane Abnormalities on the Viscoelastic Properties of Erythrocyte Membrane", Biophys. J. 51(1987), 363-369.
- Wolf H., Rols M. P., Boldt E., Neumann E. and Teissie J. 1994. "Control by Pulse Parameters of Electric Field-Mediated Gene Transfer in Mammalian Cells", Biophys. J. 66(1994), 524-531.
- Xie T. D. and Tsong T. Y. 1990. "Study of Mechanisms of Electric Field-Induced DNA Transfection. II. Transfection by Low-Amplitude, Low-Frequency Alternating Electric Fields", Biophys. J. 58(1990), 897-903.
- Zimmermann U. 1982. "Electric Field-Mediated Fusion and Related Electrical Phenomena", Biochimica et Biophysica Acta. 694(1982), 227-277.
- Zimmermann U., Beckers F. and Coster H. G. L. 1977. "The Effect of Pressure on the

Electrical Breakdown in the Membranes of *Valonia utricularis*",  
Biochimica et Biophysica Acta. 464(1977), 399-416.

Zimmermann U. and Neil G. A., 1996. Electromanipulation of cells. Boca Raton : CRC  
Press.

\_\_\_\_\_ and Vienken J. 1982. "Electric Field-Induced Cell-to-Cell Fusion",  
J. Membrane Biol. 67(1982), 165-182.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก 1

ส่วนประกอบของสูตรอาหาร VW (Vacin and Went, 1949) pH 5.7-5.8

ส่วนประกอบ	น้ำหนักหรือปริมาตรต่อของอาหาร
สารละลายเข้มข้น A	10 ml
สารละลายเข้มข้น B	10 ml
สารละลายเข้มข้น C	10 ml
Sucrose 2 %	20 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ละลายด้วย HCl 0.1 N	0.2 g
น้ำมะพร้าว	150 ml
วุ้นนางเงือก	6.8 g

## สารละลายเข้มข้น A

ส่วนประกอบ	Total g/1000 ml required
KNO <sub>3</sub>	52.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 g

## สารละลายเข้มข้น B

ส่วนประกอบ	Total g/100 ml required
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	25 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.57 g

## สารละลายเข้มข้น C

ส่วนประกอบ	Total g/100 ml required
Na <sub>2</sub> EDTA	3.725 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.785 g

## ภาคผนวก 2

วิธีการตรวจสอบการมีผนังเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมสีโพโทพลาสต์ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์

- 1 เตรียมสารละลายเข้มข้น โดยละลาย calcofluor white : CFW ด้วยสารละลายที่ใช้แขวนลอยโพโทพลาสต์ความเข้มข้นสารเป็น 0.1 %
- 2 เตรียมแผ่นไมโครสโคปสไลด์ และแผ่นแก้วปิดสไลด์
- 3 สุ่มโพโทพลาสต์ที่ต้องการตรวจสอบการมีชีวิตมา หยดลงแผ่นไมโครสโคปสไลด์
- 4 หยดสารเรืองแสง CFW จำนวน 1 หยด ให้ผสมกับโพโทพลาสต์
- 5 สังเกตการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโพโทพลาสต์ภายใต้แสง UV เซลล์ที่ผนังเซลล์จะติดสีและเรืองแสงเป็นสีเหลือง อมส้ม

วิธีการตรวจสอบการมีชีวิตของโพโทพลาสต์โดยเทคนิคการเรืองแสง

- 1 เตรียมสารละลายเข้มข้นของ Fluorescein diacetate : FDA 0.5 % โดยชั่งสาร FDA 0.25 g ละลายด้วยอะซิโตน 50 ml
- 2 หยดสารละลาย FDA ลงในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  ปริมาตร 5 ml จนเป็นสีขุ่น
- 3 หยดสารละลายในข้อ 2 จำนวน 1 หยด ลงบนแผ่นสไลด์สำหรับนับความหนาแน่นเซลล์และผสมกับ 1 หยดของโพโทพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$  แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วสำหรับปิดสไลด์
- 4 ทิ้งไว้ 2-5 นาที แล้วสังเกตเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับปรับแสงให้พอเหมาะ และเลื่อนหาตำแหน่งที่เห็นเซลล์ชัดเจนด้วยปุ่มปรับความชัดชนิดหยาบและละเอียด แล้วทำการนับเซลล์ทั้งหมด
- 5 ปิดแสงจากกล้องจุลทรรศน์แล้วเปิดแสง UV ที่ฐานกล้องเพื่อดูการเรืองแสงของเซลล์ เซลล์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงเป็นสีเขียวหรือเหลือง เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่ปรากฏให้เห็น นับเซลล์ที่เรืองแสงแล้วนำมาคำนวณความมีชีวิต

$$\text{Viability} = (\text{จำนวนเซลล์ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}) \times 100$$

### วิธีการหาค่าความหนืดของสารละลายสำหรับใช้แขวนลอยโพรโทพลาสต์

- 1 เตรียมสารละลายน้ำตาลแมนนิทอล และสารละลายซูโครส ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน  $0.3 \text{ kmol.m}^{-3}$ ,  $0.4 \text{ kmol.m}^{-3}$ ,  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$ ,  $0.6 \text{ kmol.m}^{-3}$  และ  $0.7 \text{ kmol.m}^{-3}$  ตามลำดับ อย่างละ 20 ml
- 2 หาความหนาแน่นของสารละลายทุกความเข้มข้นโดยเทียบมวลกับปริมาตรของสาร โดยนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมาอย่างละ 200  $\mu\text{l}$  นำไปชั่งน้ำหนักซ้ำ 5 ครั้งทุกความเข้มข้นแล้วนำมาคำนวณหาค่าความหนาแน่นดังสมการ

$$D = \frac{m}{V}$$

D = ความหนาแน่นของสารละลาย ( $\text{kg.m}^{-3}$ )

m = มวลของสาร (kg)

V = ปริมาตรของสารละลาย ( $\text{m}^3$ )

- 3 นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นต่างๆ กันมาอย่างละ 2 ml ใส่ในกระเปาะของเครื่องวัดความหนืด
- 4 ดูดสารขึ้นไปยังกระเปาะอีกด้านหนึ่งที่เชื่อมกันด้วยจุกยาง ให้สารเคลื่อนที่ขึ้นไปยังตำแหน่งที่กำหนดเครื่องหมายไว้โดยให้เลยขีดบนไปพอประมาณเพื่อสามารถจับเวลาได้
- 5 ปลอ่ยให้สารละลายไหลไปตามท่อกระเปาะ โดยให้เริ่มจับเวลาการไหลตั้งแต่ขีดบนจนถึงขีดล่างทำซ้ำ 5 ครั้งบันทึกแล้วหาค่าเวลาเฉลี่ย แทนค่าในสมการ

$$\eta = D.v$$

$\eta$  = ความหนืด ( $\text{kg.s}^{-1}.\text{m}^{-1}$ )

D = ความหนาแน่น ( $\text{kg.m}^{-3}$ )

v = kinematic viscosity ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ) เมื่อ

$$v = k.t$$

$k =$  ค่าคงที่สำหรับอุปกรณ์วัดความหนืด ( $1.1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$ )

$t =$  เวลาเฉลี่ย (s)

ตาราง 12 ความหนาแน่นของสารละลายแมนนิทอล

ความเข้มข้นของสารละลายแมนนิทอล ( $\text{kmol} \cdot \text{m}^{-3}$ )	m ( $\times 10^{-3} \text{ kg}$ )	V ( $\times 10^{-9} \text{ m}^3$ )	D ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ )
0.3	$0.187 \pm 0.002$	200	$935 \pm 0.002$
0.4	$0.191 \pm 0.001$	200	$955 \pm 0.001$
0.5	$0.201 \pm 0.001$	200	$1005 \pm 0.001$
0.6	$0.207 \pm 0.001$	200	$1035 \pm 0.001$
0.7	$0.209 \pm 0.001$	200	$1045 \pm 0.001$

ตาราง 13 ค่าความหนืดของสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของสารละลายแมนนิทอล ( $\text{kmol} \cdot \text{m}^{-3}$ )	t (s)	v ( $\times 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	D ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ )	$\eta$ ( $\times 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ )
0.3	$85.82 \pm 1.48$	$9.11 \pm 1.48$	$935 \pm 0.002$	$0.852 \pm 0.15$
0.4	$92.70 \pm 0.55$	$9.84 \pm 0.55$	$955 \pm 0.001$	$0.94 \pm 0.05$
0.5	$104.88 \pm 1.33$	$11.13 \pm 1.33$	$1005 \pm 0.001$	$1.12 \pm 0.13$
0.6	$130.28 \pm 3.44$	$13.82 \pm 3.44$	$1035 \pm 0.001$	$1.43 \pm 0.34$
0.7	$155.71 \pm 3.16$	$16.52 \pm 3.16$	$1045 \pm 0.001$	$1.73 \pm 0.32$

ตาราง 14 ความหนาแน่นของสารละลายซูโครส

ความเข้มข้นของสาร ละลายซูโครส ( $\text{kmol.m}^{-3}$ )	m ( $\times 10^3 \text{ kg}$ )	V ( $\times 10^9 \text{ m}^3$ )	D ( $\text{kg.m}^{-3}$ )
0.3	$0.189 \pm 0.001$	200	$947.4 \pm 0.001$
0.4	$0.200 \pm 0.001$	200	$999.6 \pm 0.001$
0.5	$0.203 \pm 0.002$	200	$1013.4 \pm 0.002$
0.6	$0.213 \pm 0.002$	200	$1064.3 \pm 0.002$
0.7	$0.218 \pm 0.002$	200	$1092.1 \pm 0.002$

ตาราง 15 ความหนืดของสารละลายซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น ของสารละลาย ซูโครส ( $\text{kmol.m}^{-3}$ )	t (s)	v ( $\times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	D ( $\text{kg.m}^{-3}$ )	$\eta$ ( $\times 10^{-3} \text{ N.s.m}^{-2}$ )
0.3	$98.63 \pm 1.21$	$1.05 \pm 1.21$	$947.4 \pm 0.001$	$0.99 \pm 0.61$
0.4	$113.62 \pm 0.18$	$1.21 \pm 0.18$	$999.6 \pm 0.001$	$1.21 \pm 0.28$
0.5	$117.12 \pm 2.23$	$1.24 \pm 2.33$	$1013.4 \pm 0.002$	$1.26 \pm 2.33$
0.6	$134.79 \pm 2.34$	$1.43 \pm 2.34$	$1064.3 \pm 0.002$	$1.52 \pm 2.34$
0.7	$154.55 \pm 0.33$	$1.64 \pm 0.33$	$1092.1 \pm 0.002$	$1.79 \pm 0.33$

## ภาคผนวก 3

ตาราง 16 การปรับสภาพน้ำไฟฟ้าของสารละลายแมนนิทอล  $0.5 \text{ kmol.m}^{-3}$   
 ปรับด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ KCl  $0.1 \text{ kmol.m}^{-3}$

ปริมาตรสารละลาย แมนนิทอล (ml)	ปริมาตรสารละลาย KCl ( $\mu\text{l}$ )	ค่าสภาพนำไฟฟ้า $\sigma_s$ ( $\text{mS.m}^{-1}$ )
50	0	8.0
50	100	30
50	280	70
50	300	100
50	500	150
50	900	200
50	1,300	300
50	1,700	400
50	2,500	500

## ภาคผนวก 4

ตัวอย่างการเตรียมสารละลายเข้มข้นของเกลือรังสีออร์โธฟอสเฟตในรูปของ  $\text{NH}_4\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$   
จากสมการหาความแรงของสารกัมมันตรังสี

$$A = A_0 e^{-\lambda t}$$

$A_0$  = ความแรงรังสีเริ่มต้น ที่  $t = 0$  มีค่าเป็น  $3.6 \times 10^{-3}$  Ci/1.5 ml หรือ  $2.4 \times 10^{-3}$  Ci.ml<sup>-1</sup>

$T_{1/2}$  = ครึ่งชีวิตของ P-32 เป็น 14.3 วัน  $\lambda = 0.693/T_{1/2} = 0.05$

$t$  = ช่วงเวลาที่ผ่านไปตั้งแต่วันแรกที่ผลิตสารรังสีจนถึงวันที่ทดลองให้เป็น 10 วัน

$$\text{ดังนั้นความแรงรังสีวันที่ 10 } A = 1.48 \times 10^{-3} \text{ Ci.ml}^{-1}$$

แต่ความแรงรังสีสุดท้ายที่ต้องการให้โพโทพลาสต์ดูดกลืนเป็น  $0.01 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$

ดังนั้นต้องเจือจางความแรงรังสีลงมาเพื่อเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 1 ml ดูดสารละลาย  
เกลือรังสี  $\text{NH}_4\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$  จากขวดบรรจุสารรังสี ด้วยการกระบอกฉีดยา ขนาด 1 ml มา  
จำนวน 20  $\mu\text{l}$  เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ml ดังนั้นคำนวณความแรงรังสีได้จาก  
สมการ

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$(1.48 \times 10^{-3} \text{ Ci/ml}) \times (20 \times 10^{-3} \text{ ml}) = M_2 \times 1 \text{ ml}$$

$$M_2 = 29.6 \times 10^{-6} \text{ Ci.ml}^{-1}$$

ต้องการให้มีความแรงรังสีเป็น  $0.01 \mu\text{Ci/ml}$  ในสารละลายที่มีโพโทพลาสต์แขวนลอย  
1 ml ดังนั้นจึงต้องเจือจางความแรงรังสีจาก  $29.6 \times 10^{-6} \text{ Ci.ml}^{-1}$  ลงอีกเท่าตัวด้วยวิธีการเดิมจะ  
ได้ความแรงรังสีของสารละลายเข้มข้น เป็น  $0.592 \times 10^{-6} \text{ Ci.ml}^{-1}$  จากสารละลายเข้มข้น ใส่ลง  
ในสารละลายที่แขวนลอยโพโทพลาสต์ 1 ml จะต้องใช้สารละลายเข้มข้นปริมาตรเท่าไร  
จึงจะมีความแรงสุดท้ายเป็น  $0.01 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$  โดยใช้สมการ

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$(0.592 \times 10^{-6} \text{ Ci.ml}^{-1}) \times V_1 = (0.01 \times 10^{-6} \text{ Ci.ml}^{-1}) \times 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = 16.9 \mu\text{l}$$

ดังนั้นจะต้องเติมสารละลายเกลือรังสีที่เจือจางจำนวน 16.9  $\mu\text{l}$  ลงในสารละลาย  
ที่มีโพโทพลาสต์แขวนลอยเพื่อให้ความแรงรังสีเป็น  $0.01 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$  สำหรับติดตามการดูด  
ซึมสารรังสีของโพโทพลาสต์ต่อไป

### วิธีการหาค่าความแรงรังสีจำเพาะของสารละลายอาหารเหลวสูตร VW

ค่าความแรงรังสีจำเพาะ (specific activity :  $S_0$ ) ของน้ำเลี้ยงที่ติดฉลากรังสีหาได้จากการเอาน้ำเลี้ยงนั้นจำนวนหนึ่ง และเนื่องจากความแรงของรังสีจากสารละลายที่ติดฉลากมีค่าสูงมาก เมื่อเทียบกับที่เนื้อเยื่อดูดซึมเข้าไป และปกติหัววัด Geiger Muller จะมีข้อจำกัดในการวัดปริมาณรังสี กล่าวคือ เมื่อวัดอนุภาคตัวหนึ่ง ๆ แล้ว จะต้องใช้เวลาช่วงหนึ่งเพื่อปรับตัวเตรียมอ่านอนุภาคตัวถัดไป เวลาช่วงนี้เรียกว่า Time Delay ซึ่งจะเป็นค่าเฉพาะของหัววัดแต่ละชนิด ดังนั้นการวัด  $S_0$  ที่ดีควรทำให้สารละลายติดฉลากเจือจางลงค่าหนึ่งก่อน จึงจะวัดความแรงรังสี แล้วคำนวณความแรงรังสีทั้งหมดที่ติดฉลาก

### การหาปริมาณฟอสเฟตในสารละลายน้ำเลี้ยง VW

จากภาคผนวก 1 จะเห็นว่าสูตร VW เป็นอาหารสำหรับโพธิทอปลาสต์กล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium* sp. มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบในรูปของเกลือมี 2 รูปคือ  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  แต่ละส่วนมีฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) เป็นองค์ประกอบในปริมาณต่างกัน ซึ่งสามารถหาได้ดังนี้

1) การหาปริมาณฟอสเฟตของสารละลายเกลือ  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ในน้ำเลี้ยง 1 l

ในน้ำเลี้ยง 1 l มีสารนี้อยู่ 0.2 g น้ำหนักโมเลกุลของสาร  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

ทั้งหมดเป็น  $310.24 \text{ g.mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$  มีฟอสเฟตอยู่ 190 g

ดังนั้น  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  จำนวน 0.2 g ในอาหาร 1 l จะมีฟอสเฟตอยู่

$$= \frac{190 \times 0.2}{310.24} = 0.122 \text{ g} \quad 1)$$

2) การหาปริมาณฟอสเฟตของสารละลายเกลือ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ในน้ำเลี้ยง 1 l

สาร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  เป็นสารประกอบของสารละลายเข้มข้นสูตร A (ภาค

ผนวก 1)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  มีน้ำหนักโมเลกุล  $136.09 \text{ g.mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$  มีฟอสเฟตอยู่ 95 g สารละลาย

เข้มข้นสูตร A 1 l มี  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 g

$$\text{จะมีฟอสเฟต} = \frac{95 \times 25}{136.09} = 17.45 \text{ g}$$

สารละลายเข้มข้น A 1 l จะมี  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  เป็นองค์ประกอบคิดเป็นความเข้มข้น

$$\text{ได้ว่า} \quad \frac{25}{136.09} = 0.18 \text{ kmol.m}^{-3}$$

และต้องใช้สารละลายเข้มข้น A เป็นองค์ประกอบของน้ำเลี้ยงสูตร VW 1 1 จำนวน 10 ml ดังนั้นหาความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ในน้ำเลี้ยง VW 1 1 ได้จากสมการ

$$M_1V_1 = M_2V_2 \text{ โดยที่}$$

$$M_1 = \text{ความเข้มข้นของสารละลาย } \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ จาก สารละลายเข้มข้น } 0.18 \text{ kmol.m}^{-3}$$

$$M_2 = \text{ความเข้มข้นของสารละลาย } \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ ในน้ำเลี้ยง 1 1}$$

$$V_1 = \text{ปริมาตรของสารละลาย } \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ ที่ดึงมาจากสารละลายเข้มข้น A } 10 \text{ ml}$$

$$V_2 = \text{ปริมาตรของน้ำเลี้ยงที่ต้องการเตรียม นั่นคือ } 1 \text{ l}$$

$$\text{แทนค่า} \quad 0.19 \text{ M} \times 10 \text{ ml} = M_2 \times 1000 \text{ ml}$$

$$M_2 = \frac{0.18 \times 10 \text{ Mml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$M_2 = 1.8 \times 10^{-3} \text{ kmol.m}^{-3}$$

ดังนั้น สารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ในน้ำเลี้ยง 1 1 มีความเข้มข้น  $1.8 \times 10^{-3} \text{ kmol.m}^{-3}$

สารละลายเข้มข้น A มี  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ความเข้มข้น  $0.18 \text{ kmol.m}^{-3}$  จะมีฟอสเฟต 17.45 g

น้ำเลี้ยง VW 1 1 มีสารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  เป็นองค์ประกอบความเข้มข้น  $1.8 \times 10^{-3} \text{ kmol.m}^{-3}$

$$\text{มีฟอสเฟต} = \frac{17.45 \times 1.8 \times 10^{-3}}{0.18} = 0.1745 \text{ g}$$

ดังนั้นในน้ำเลี้ยง 1 1 จะมีฟอสเฟตจากสารละลายเกลือ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1745 g 2)

รวมปริมาณฟอสเฟตในน้ำเลี้ยง VW 1 1 จาก 1) และ 2) ได้เป็น 0.2965 g

ดังนั้นถ้าใช้น้ำเลี้ยง 20  $\mu\text{l}$  จะมีฟอสเฟต 5.93  $\mu\text{g}$

คิดเทียบเป็น mol

ฟอสเฟต  $\text{PO}_4^{3-}$  95 g คิดเป็น 1 mol

ฟอสเฟต  $5.93 \times 10^{-6}$  g คิดเป็น  $62.42 \times 10^{-9}$  mol หรือ 62.42 nmol

ดังนั้นน้ำเลี้ยงที่คิดจลกรังสีและสุ่มตัวอย่างมาหาอัตรานับรังสีปริมาณ 20  $\mu\text{l}$  จะมีฟอสเฟตที่เสถียรอยู่ 62.42 nmol ทำให้สามารถหาค่า  $S_0$  ได้ ในหน่วยอัตรานับต่อโมลของไอโซโทปที่เสถียร เพื่อนำไปคำนวณหาฟลักซ์ตามสมการที่ (31) ในบทที่ 2 ต่อไป

## ภาคผนวก 5

ผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ผสม

ตาราง 17 จำนวนโพทิโพลาสต์ที่แยกได้ด้วยสารละลายเอนไซม์ผสม 4 สูตร

ใช้เวลาในการย่อย 3 ชั่วโมง

เอนไซม์ผสม	จำนวนโพทิโพลาสต์ ( $\times 10^4$ per ml)			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$
Cellulase1%, Driselase1%,Marcerozyme0.5%	4.00	4.50	5.20	$4.57 \pm 0.67$
Cellulase1%, Marcerozyme0.5%	2.15	2.00	3.00	$2.38 \pm 0.54$
Cellulase2%, Driselase1%, Marcerozyme0.5%	5.90	6.30	6.00	$5.97 \pm 0.34$
Cellulase2%, Marcerozyme0.5%	3.50	4.20	3.00	$3.57 \pm 0.60$

ตาราง 18 จำนวนโพทิโพลาสต์ที่แยกด้วยละลายเอนไซม์ผสมสูตรที่ 3

เวลา (h)	จำนวนโพทิโพลาสต์ ( $\times 10^4$ per ml)			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$
3	6.00	5.10	5.90	$5.67 \pm 0.49$
4	10.90	10.10	9.20	$10.07 \pm 0.85$
5	4.10	5.50	4.30	$4.63 \pm 0.76$

ตาราง 19 ขนาดโพรโทพลาสต์เฉลี่ย

ขนาดโพรโทพลาสต์ ( $\mu\text{m}$ )	จำนวนโพรโทพลาสต์	ผลคูณของขนาด และ จำนวนโพรโทพลาสต์	ขนาดโพรโทพลาสต์ เฉลี่ย ( $\mu\text{m}$ )
$51.67 \pm 2.63$	$54.67 \pm 4.04$	$2824.80 \pm 4.82$	$50.22 \pm 2.04$
$45.00 \pm 0.00$	$20.00 \pm 4.58$	$900.00 \pm 4.58$	
$60.00 \pm 0.00$	$17.00 \pm 4.00$	$1020.00 \pm 4.00$	
$33.33 \pm 2.89$	$8.33 \pm 0.58$	$277.64 \pm 2.08$	
รวม	100	$5022.44 \pm 4.16$	

## ภาคผนวก 6

การยึดตัวของเซลล์ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ

Mahaworasilpa (1992) เสนอว่าแรงที่ทำให้เซลล์ทรงกลมยึดตัวเกิดจากไดโพลภายในเซลล์เมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ พิจารณาเซลล์ชีวภาพทรงกลมที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้าต้านทานกิริยาของไดโพลกับสนามไฟฟ้าภายนอกเหนี่ยวนำให้เกิดแรงดึงเชื่อมหุ้มเซลล์ไปได้สองทิศทางตรงข้ามกัน แรงดึงนี้จะเปลี่ยนแปลงตามขนาดของไดโพล (ตามภาพประกอบ 32)

แรงดึงจะมีค่ามาก เมื่อ  $\theta = 0$  หรือ  $\pi$  rad และแรงดึงจะมีค่าเป็นศูนย์ เมื่อ  $\theta = -\pi/2$  หรือ  $3\pi/2$  rad ซึ่งอยู่ในแนวตั้งฉากกับทิศทางของสนามไฟฟ้า

จากสมการไดโพลโมเมนต์ของเซลล์ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ แรงดึงรวม ( $F_d$ ) ของไดโพล เมื่อให้สนามไฟฟ้า  $E$  เขียนความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$|F_d| = |F_1 - F_2| = \frac{|\mu_{\text{eff}}| |E|}{Z_{\text{eff}}} \quad (\text{A1})$$

เมื่อ  $F_1$  และ  $F_2$  เป็นแรงที่ทำให้เกิดไดโพล

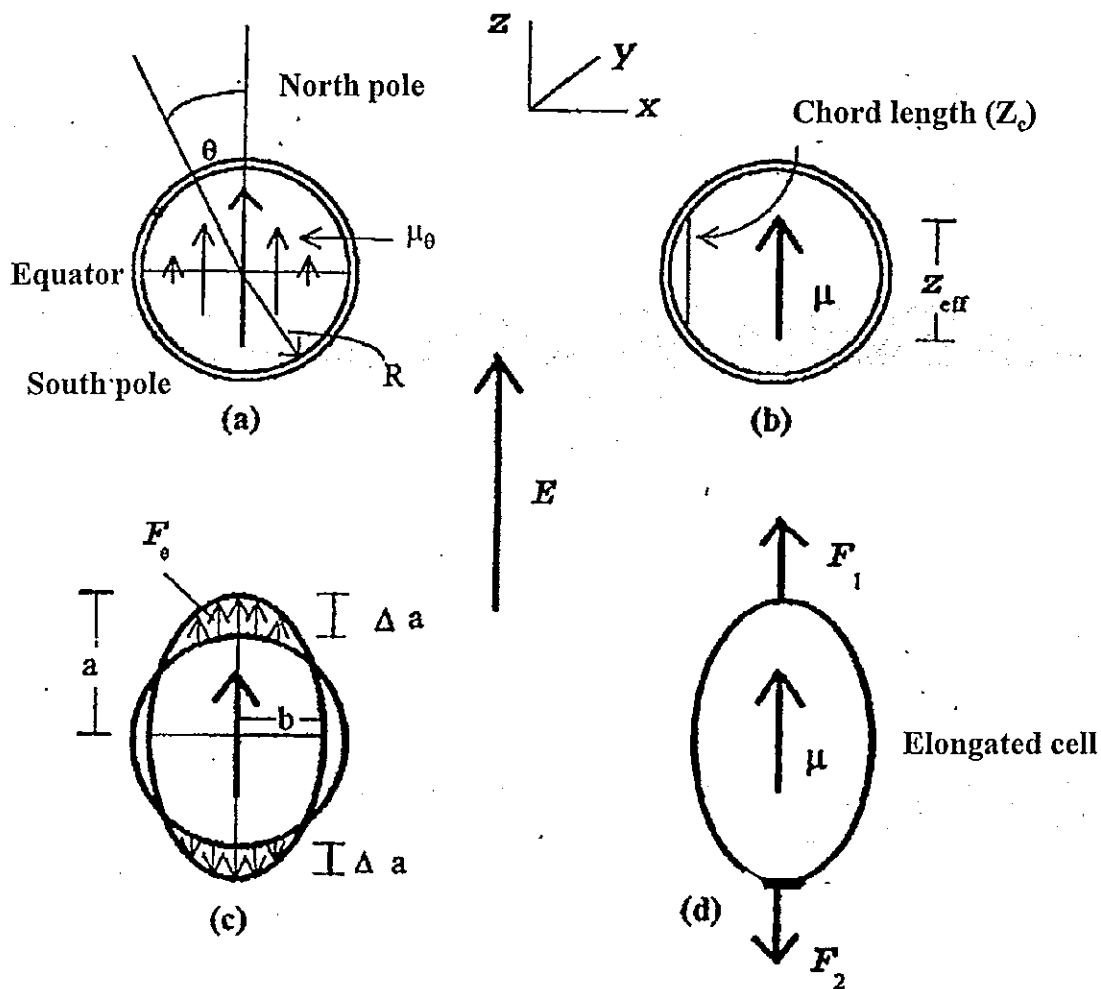
$Z_{\text{eff}}$  เป็น การแยกของไดโพลยังผล

$Z_{\text{eff}}$  สามารถเขียนในเทอมของความยาวคอร์รัคเฉลี่ย  $Z_c(\text{av})$  ซึ่งพิจารณาในแนวแกน  $Z$  ได้ว่า

$$Z_{\text{eff}} = Z_c(\text{av}) = 2 \frac{\int_0^{\pi/2} R \cos \theta d(\sin \theta) \int_0^{\pi/2} d\phi}{\int_0^{\pi/2} d(R \sin \theta) \int_0^{\pi/2} d\phi}$$

$$Z_{\text{eff}} = \frac{\pi R}{2} \quad (\text{A2})$$

เมื่อ  $R$  = รัศมีเซลล์ที่ยังไม่ยึดตัว



ภาพประกอบ 32 แบบจำลองการเปลี่ยนรูปของเซลล์ทรงกลมเนื่องจากแรงดึงดูดไฟฟ้า

(a) การเหนี่ยวนำให้เกิดไดโพลโมเมนต์ในเซลล์ไดอิเล็กทริกทรงกลม

มีหลายขนาดทำมุม  $\theta$  กับเส้นระนาบ

(b) ผลรวมของไดโพลโมเมนต์,  $\mu$  ที่ความยาวคอर्ड  $Z_c$  หรือเท่ากับ ความยาวคอर्डเฉลี่ย  $Z_{eff} = \pi R/2$

(c) แรงดึง,  $F_0$  เกิดจากไดโพลโมเมนต์,  $\mu_0$  เนื่องจากเซลล์เปลี่ยนรูป ในครึ่งแกนเอก,  $a$

(d) แรงสุทธิ  $F_1$  และ  $F_2$  ในแนวเหนือ-ใต้ของครึ่งหนึ่งของทรงกลม ทำให้เซลล์ยืดตัวขนานกับทิศของสนามไฟฟ้า

ที่มา : Mahaworasilpa, 1992.

## ภาคผนวก 7

ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนการยี่ด (a/b) ของโพรโทพลาสต์ (*Dendrobium* sp.) กับ  
ความเข้มสนามไฟฟ้า ความถี่ และเวลาในสนามไฟฟ้า

ตาราง 20 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 0.5 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์  
 $48.30 \pm 1.37 \mu\text{m}$   $\sigma_1$   $1 \text{ mS.m}^{-1}$

Time(min)	a/b			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
0.5	1.02±0.03	1.06±0.01	1.09±0.03	1.10±0.05
1.0	1.03±0.03	1.10±0.02	1.15±0.03	1.19±0.03
1.5	1.04±0.02	1.10±0.02	1.22±0.02	1.24±0.02
2.0	1.05±0.02	1.10±0.02	1.23±0.01	1.30±0.03
3.0	1.05±0.02	1.10±0.02	1.23±0.01	1.31±0.02
4.0	1.06±0.02	1.10±0.02	1.24±0.02	1.33±0.03
5.0	1.06±0.02	1.10±0.02	1.24±0.02	1.33±0.03

ตาราง 21 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 1 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์  
 $47.59 \pm 1.56 \mu\text{m}$   $\sigma, 1 \text{ mS.m}^{-1}$

Time(min)	a/b			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
0.5	1.00±0.00	1.08±0.02	1.13±0.04	1.26±0.03
1.0	1.00±0.00	1.13±0.02	1.19±0.03	1.31±0.03
1.5	1.00±0.00	1.13±0.02	1.25±0.05	1.39±0.05
2.0	1.00±0.00	1.13±0.02	1.30±0.03	1.42±0.05
3.0	1.00±0.00	1.13±0.02	1.31±0.04	1.45±0.02
4.0	1.00±0.00	1.13±0.02	1.34±0.05	1.45±0.02
5.0	1.00±0.00	1.13±0.02	1.34±0.05	1.46±0.02

ตาราง 22 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 5 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์  
 $46.69 \pm 1.24 \mu\text{m}$   $\sigma, 1 \text{ mS.m}^{-1}$

Time(min)	a/b			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
0.5	1.02±0.01	1.04±0.01	1.08±0.02	1.10±0.03
1.0	1.04±0.01	1.07±0.02	1.11±0.02	1.15±0.01
1.5	1.04±0.01	1.09±0.02	1.17±0.02	1.18±0.01
2.0	1.04±0.01	1.09±0.01	1.17±0.02	1.21±0.00
3.0	1.04±0.002	1.09±0.02	1.17±0.01	1.22±0.00
4.0	1.04±0.01	1.09±0.01	1.17±0.02	1.22±0.00
5.0	1.04±0.02	1.09±0.02	1.17±0.02	1.22±0.01

ตาราง 23 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 10 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์  
 $48.00 \pm 1.35 \mu\text{m}$   $\sigma_s 1 \text{ mS.m}^{-1}$

Time(min)	a/b			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
0.5	1.03±0.02	1.04±0.01	1.08±0.02	1.12±0.01
1.0	1.05±0.02	1.04±0.01	1.14±0.01	1.16±0.01
1.5	1.05±0.02	1.07±0.02	1.18±0.02	1.18±0.02
2.0	1.05±0.02	1.10±0.02	1.18±0.01	1.21±0.01
3.0	1.05±0.02	1.10±0.02	1.20±0.01	1.23±0.01
4.0	1.05±0.02	1.10±0.02	1.20±0.01	1.23±0.01
5.0	1.05±0.02	1.10±0.02	1.20±0.02	1.23±0.01

ตาราง 24 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่เวลาในการให้สนามไฟฟ้า 3 นาที  $\sigma_s 1 \text{ mS.m}^{-1}$

Frequency (MHz)	a/b			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0.5	1.05±0.02	1.10±0.02	1.23±0.01	1.31±0.03
1	1.00±0.00	1.13±0.02	1.31±0.03	1.45±0.05
5	1.04±0.02	1.09±0.02	1.17±0.01	1.22±0.00
10	1.05±0.02	1.10±0.02	1.20±0.01	1.23±0.01

ตาราง 25 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 0.5 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์

$$47.29 \pm 1.39 \mu\text{m} \quad \sigma_s 20 \text{ mS.m}^{-1}$$

Time(min)	a/b			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
0.5	1.00±0.00	1.04±0.04	1.04±0.00	1.04±0.01
1.0	1.00±0.00	1.05±0.03	1.05±0.01	แตก
2.0	1.00±0.00	1.10±0.05	1.12±0.00	แตก
3.0	1.00±0.00	1.10±0.05	1.12±0.01	แตก
4.0	1.00±0.00	1.10±0.05	1.13±0.00	แตก
5.0	1.00±0.00	1.10±0.05	1.13±0.00	แตก

ตาราง 26 a/b ของโพรโทพลาสต์ที่ความถี่ 1 MHz ขนาดโพรโทพลาสต์

$$46.94 \pm 1.12 \mu\text{m} \quad \sigma_s 20 \text{ mS.m}^{-1}$$

Time(min)	a/b			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
0.5	1.05±0.01	1.05±0.03	1.09±0.02	1.09±0.01
1.0	1.05±0.01	1.07±0.01	1.10±0.01	1.12±0.01
1.5	1.05±0.02	1.08±0.01	1.11±0.02	1.12±0.01
2.0	1.05±0.01	1.10±0.04	1.12±0.02	1.15±0.02
3.0	1.05±0.01	1.11±0.03	1.13±0.02	1.15±0.01
4.0	1.05±0.02	1.11±0.02	1.13±0.01	1.15±0.01
5.0	1.05±0.01	1.11±0.03	1.13±0.02	1.15±0.01

ตาราง 27 a/b ของโพทโทพลาสต์ที่ความถี่ 5 MHz ขนาดโพทโทพลาสต์  
 $47.18 \pm 1.12 \mu\text{m}$   $\sigma_s$  20  $\text{mS.m}^{-1}$

Time(min)	a/b			
	30 $\text{kV.m}^{-1}$	45 $\text{kV.m}^{-1}$	60 $\text{kV.m}^{-1}$	85 $\text{kV.m}^{-1}$
0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
0.5	1.00±0.00	1.06±0.03	1.15±0.03	1.18±0.01
1.0	1.00±0.00	1.08±0.02	1.21±0.03	1.25±0.00
1.5	1.00±0.00	1.08±0.02	1.21±0.03	1.26±0.02
2.0	1.00±0.00	1.08±0.02	1.25±0.03	1.32±0.04
3.0	1.00±0.00	1.09±0.01	1.30±0.03	1.37±0.01
4.0	1.00±0.00	1.09±0.01	1.30±0.03	1.37±0.01
5.0	1.00±0.00	1.09±0.01	1.30±0.03	1.37±0.01

ตาราง 28 a/b ของโพทโทพลาสต์ที่ความถี่ 10 MHz ขนาดโพทโทพลาสต์  
 $45.52 \pm 1.20 \mu\text{m}$   $\sigma_s$  20  $\text{mS.m}^{-1}$

Time(min)	a/b			
	30 $\text{kV.m}^{-1}$	45 $\text{kV.m}^{-1}$	60 $\text{kV.m}^{-1}$	85 $\text{kV.m}^{-1}$
0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
0.5	1.00±0.00	1.06±0.01	1.10±0.05	1.21±0.02
1.0	1.01±0.01	1.06±0.01	1.13±0.03	1.24±0.02
1.5	1.01±0.01	1.06±0.01	1.14±0.03	1.24±0.02
2.0	1.01±0.01	1.06±0.01	1.16±0.03	1.24±0.02
3.0	1.01±0.01	1.06±0.01	1.16±0.03	1.24±0.02
4.0	1.01±0.01	1.06±0.01	1.16±0.03	1.24±0.02
5.0	1.01±0.01	1.06±0.01	1.16±0.03	1.24±0.02

ตาราง 29 a/b ของโพทโทพลาสติกที่เวลาในการให้สนามไฟฟ้า 3 นาที  $\sigma_s$  20  $\text{mS.m}^{-1}$

Frequency (MHz)	a/b			
	30 $\text{kV.m}^{-1}$	45 $\text{kV.m}^{-1}$	60 $\text{kV.m}^{-1}$	85 $\text{kV.m}^{-1}$
0.5	1.00±0.00	1.10±0.05	1.12±0.01	แตก
1	1.05±0.01	1.11±0.03	1.13±0.02	1.15±0.01
5	1.00±0.00	1.09±0.01	1.30±0.03	1.37±0.01
10	1.01±0.01	1.06±0.01	1.16±0.03	1.24±0.02

ตาราง 30 a/b ของโพทโทพลาสติก ที่ความถี่ต่างๆ กัน เมื่อให้สนามไฟฟ้าเป็นเวลา 1.5 นาที

$\sigma_s$ ( $\text{mS.m}^{-1}$ )	frequency (MHz)	85 $\text{kV.m}^{-1}$	60 $\text{kV.m}^{-1}$	45 $\text{kV.m}^{-1}$	30 $\text{kV.m}^{-1}$
1	0.5	1.23±0.04	1.14±0.04	1.13±0.04	1.03±0.04
	1	1.17±0.04	1.13±0.04	1.11±0.04	1.04±0.04
	3	1.16±0.04	1.13±0.04	1.10±0.02	1.03±0.03
	5	1.15±0.04	1.13±0.04	1.10±0.04	1.03±0.03
	10	1.13±0.03	1.11±0.04	1.06±0.00	1.01±0.03
20	0.5	แตก	1.08±0.02	1.06±0.02	1.01±0.02
	1	1.09±0.02	1.09±0.02	1.06±0.02	1.02±0.03
	3	1.14±0.04	1.12±0.02	1.07±0.02	1.01±0.03
	5	1.16±0.02	1.14±0.03	1.12±0.04	1.02±0.01
	10	1.15±0.03	1.13±0.02	1.07±0.02	1.02±0.00

ตาราง 31 เปรียบเทียบระยะขีดของโพรโทพลาสต์ที่เวลาในสนามไฟฟ้า 5 นาที

$\sigma_s$ (mS.m <sup>-1</sup> )	frequency (MHz)	E (kV.m <sup>-1</sup> )	a/b
1	0.5	30	1.06±0.02
		45	1.10±0.02
		60	1.24±0.02
		85	1.33±0.03
	1	30	1.00±0.00
		45	1.13±0.02
		60	1.34±0.05
		85	1.46±0.02*
	5	30	1.04±0.02
		45	1.09±0.02
		60	1.17±0.02
		85	1.22±0.01
	10	30	1.05±0.02
		45	1.10±0.02
		60	1.20±0.02
		85	1.23±0.01
20	0.5	30	1.00±0.00
		45	1.10±0.05
		60	1.13±0.00
	1	85	แตก
		30	1.05±0.01
		45	1.11±0.03
		60	1.13±0.02

ตาราง 31 (ต่อ)

$\sigma_s$ (mS.m <sup>-1</sup> )	frequency (MHz)	E (kV.m <sup>-1</sup> )	a/b
20	1	85	1.15±0.01
		30	1.00±0.00
		45	1.09±0.01
		60	1.30±0.03
		85	1.37±0.01*
	10	30	1.01±0.01
		45	1.06±0.01
		60	1.16±0.01
		85	1.24±0.02

\* ค่าสูงสุดที่ได้จากการทดลองสำหรับแต่ละสภาพนำไฟฟ้า

## ภาคผนวก 8

ตาราง 32 ระยะยัด a และ b เมื่อ  $\sigma_1 1 \text{ mS.m}^{-1}$  ที่เวลาในสนามไฟฟ้า 3 นาที

Frequency MHz	30 kV.m <sup>-1</sup>		45 kV.m <sup>-1</sup>		60 kV.m <sup>-1</sup>		85 kV.m <sup>-1</sup>		Protoplast diameter ( $\mu\text{m}$ )
	a	b	a	b	a	b	a	b	
0.5	26.02	24.60	25.21	22.79	27.64	22.39	26.42	20.37	48.36
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00	1.09	1.12	1.05	0.35	0.00	0.92	1.04	1.72
1	23.60	23.60	25.00	22.18	28.03	21.38	28.03	19.36	49.68
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.05	1.05	1.17	1.13	1.22	1.12	1.16	0.48	1.86
5	23.79	22.99	24.40	22.39	27.83	23.80	28.03	22.99	46.68
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.92	0.61	1.14	1.01	1.19	1.16	1.09	1.06	1.98
10	25.00	23.80	25.41	23.19	25.81	21.58	26.22	21.38	48.14
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.92	0.35	1.05	1.15	0.35	1.13	1.24	1.26	1.82

ตาราง 33 ระยะขีด a และ b เมื่อ  $\sigma, 1 \text{ mS.m}^{-1}$  ที่เวลาในสนามไฟฟ้า 3 นาที

Frequency (MHz)	30 kV.m <sup>-1</sup>		45 kV.m <sup>-1</sup>		60 kV.m <sup>-1</sup>		85 kV.m <sup>-1</sup>		Protoplast diameter ( $\mu\text{m}$ )
	a	b	a	b	a	b	a	b	
0.5	23.60	23.60	25.00	22.79	24.61	23.39	แตก	แตก	48.30
	±	±	±	±	±	±			±
	1.00	1.00	1.17	0.70	1.15	1.15			1.29
1	24.40	23.60	22.39	20.17	23.80	21.18	22.59	19.76	46.76
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.09	1.12	0.60	0.64	0.35	1.11	0.35	1.05	1.29
5	23.19	23.19	25.41	23.39	26.42	20.37	27.83	20.57	47.19
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.95	0.95	0.61	0.35	0.35	0.95	1.02	0.00	1.28
10	22.18	21.98	23.80	22.39	24.60	21.18	24.40	19.76	46.18
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.92	0.92	1.00	1.05	0.75	0.99	1.04	1.01	1.39

ตาราง 34 ค่า K จากข้อมูล a/b ของโพโรทพลาสติกที่อยู่ในสนามไฟฟ้าขนาด 3 นาที่

$\sigma_s$ (mS.m <sup>-1</sup> )	Frequency (MHz)	E (kV.m <sup>-1</sup> )	K (mN.m <sup>-1</sup> )	K เฉลี่ย (mN.m <sup>-1</sup> )	
1	0.5	30	0.038	0.035±0.009	
		45	0.041		
		60	0.032		
		85	0.052		
	1	30	หาค่าไม่ได้		
			a/b=1		
		45	0.027		
		60	0.020		
	5	5	85		0.030
			30		0.036
			45		0.037
			60		0.033
	10	10	85		0.053
			30		0.028
			45		0.030
			60		0.029
20	0.5	85	0.050	0.038±0.007	
		30	หาค่าไม่ได้		
			a/b=1		
		45	0.030		
	1	1	60		0.044
			85		แตก
			30		0.028
			45		0.028

ตาราง 34 (ต่อ)

$\sigma_s$ (mS.m <sup>-1</sup> )	Frequency (MHz)	E (mN.m <sup>-1</sup> )	K (mN.m <sup>-1</sup> )	K เฉลี่ย (mN.m <sup>-1</sup> )	
20	1	60	0.044	0.038±0.007	
		85	0.047		
	5	30	หาค่าไม่ได้ (a/b=1)		
		45	0.034		
		60	0.030		
		85	0.031		
		10	30		0.044
			45		0.053
	60		0.036		
	85		0.047		

ตาราง 35 ความเค้นของโพรโทพลาสติกที่อยู่ในสนามนาน 3 นาที  $\sigma_s$  1 mS.m<sup>-1</sup>

Frequency (MHz)	Stress (mN.m <sup>-2</sup> )			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0.5	7.83±1.36	36.67±1.23	151.82±1.93	183.37±1.47
1	26.83±1.58	67.62±1.20	187.31±1.64	342.50±1.49
5	27.07±1.58	66.31±1.12	201.42±1.71	188.92±1.62
10	4.24±1.50	53.02±1.49	112.26±1.43	135.22±1.75

ตาราง 36 ความเค้นของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามนาน 3 นาที  $\sigma$ , 20 mS.m<sup>-1</sup>

Frequency (MHz)	Stress (mN.m <sup>-2</sup> )			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0.5	0	50.22±2.38	35.42±2.24	0
1	29.07±2.43	58.77±1.80	69.99±1.48	100.27±1.69
5	4.52±2.26	43.94±1.67	194.75±1.57	224.74±1.63
10	0.55±2.11	26.13±2.26	84.80±1.99	103.48±1.80

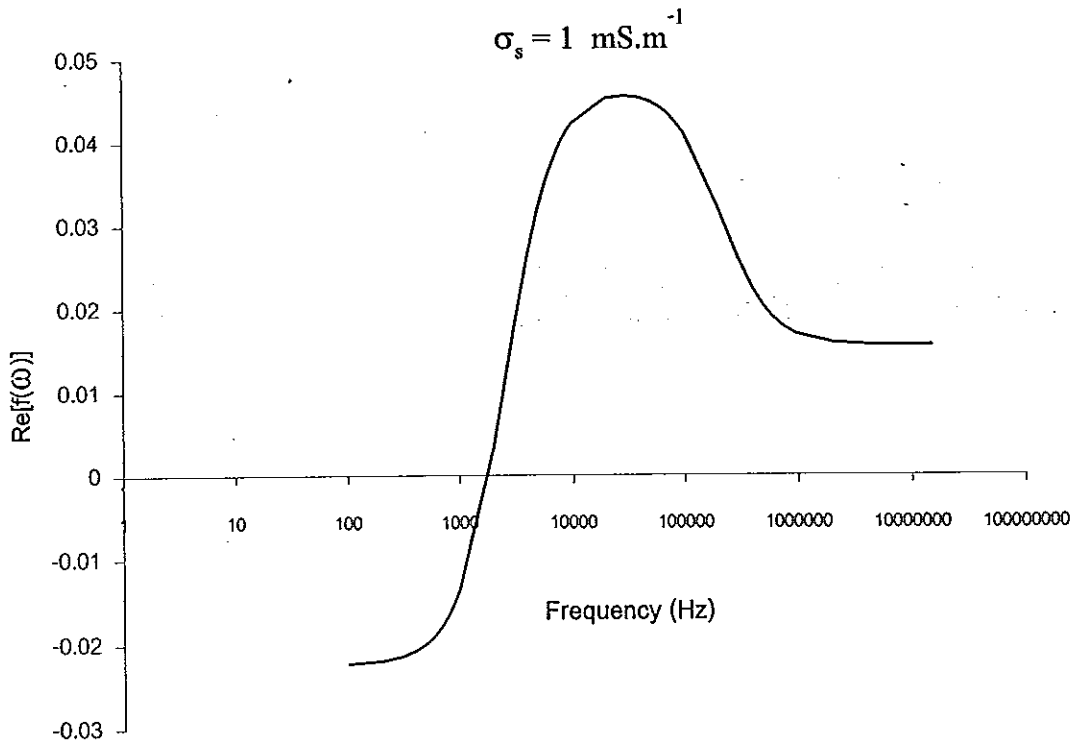
ตาราง 37 ความเครียดของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามนาน 3 นาที  $\sigma$ , 1 mS.m<sup>-1</sup>

Frequency (MHz)	Strain			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0.5	0.008±0.001	0.032±0.000	0.117±0.001	0.122±0.000
1	0.026±0.001	0.056±0.001	0.130±0.001	0.194±0.000
5	0.026±0.001	0.057±0.000	0.174±0.001	0.151±0.001
10	0.004±0.001	0.048±0.000	0.086±0.000	0.100±0.001

ตาราง 38 ความเครียดของโพรโทพลาสต์ที่อยู่ในสนามนาน 3 นาที  $\sigma$ , 20 mS.m<sup>-1</sup>

Frequency (MHz)	Strain			
	30 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	60 kV.m <sup>-1</sup>	85 kV.m <sup>-1</sup>
0.5	0	0.044±0.001	0.032±0.001	0
1	0.028±0.001	0.051±0.001	0.056±0.000	0.078±0.000
5	0.004±0.001	0.039±0.001	0.130±0.000	0.145±0.001
10	0.001±0.001	0.024±0.001	0.066±0.001	0.071±0.001

## ภาคผนวก 9



ภาพประกอบ 33 ความสัมพันธ์ระหว่างความถี่กับค่าจริงของฟังก์ชันความถี่

ของโพโรโทพลาสติก *Dendrobium* sp. ที่สภาพนำไฟฟ้า  $1 \text{ mS.m}^{-1}$

(สรวิชัย, 2541)

สภาพยอมทางไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ ( $\epsilon_m$ ) =  $22\epsilon_0$

สภาพยอมทางไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม ( $\epsilon_c$ ) =  $84\epsilon_0$

สภาพยอมทางไฟฟ้าของสารละลาย ( $\epsilon_s$ ) =  $80\epsilon_0$

สภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม ( $\sigma_c$ ) =  $1.15 \text{ mS.m}^{-1}$

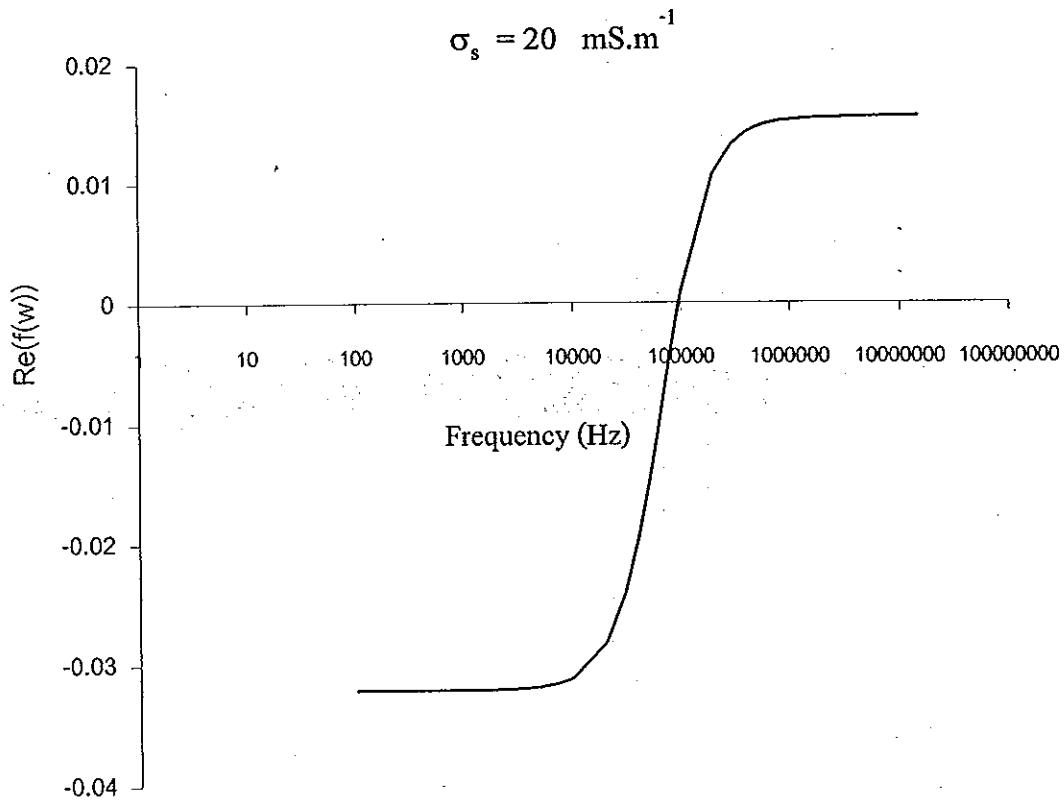
สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายภายนอก ( $\sigma_s$ ) =  $1 \text{ mS.m}^{-1}$

สภาพนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ ( $\sigma_m$ ) =  $3 \text{ } \mu\text{S.m}^{-1}$

ความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์ ( $\delta$ ) =  $15 \text{ nm}$

เมื่อ  $\epsilon_0$  เป็นสภาพยอมทางไฟฟ้าของสุญญากาศ =  $8.85 \times 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$

รัศมีเซลล์ ( $R$ ) =  $25 \text{ } \mu\text{m}$



ภาพประกอบ 34 ความสัมพันธ์ระหว่างความถี่กับค่าจริงของฟังก์ชันความถี่  
ของโพโรโทพลาสติก *Dendrobium* sp. ที่สภาพร่าไฟฟ้า  $20 \text{ mS.m}^{-1}$   
(สรวิชาติ, 2541)

$$\text{สภาพยอมทางไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์} (\epsilon_m) = 22\epsilon_0$$

$$\text{สภาพยอมทางไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม} (\epsilon_c) = 84\epsilon_0$$

$$\text{สภาพยอมทางไฟฟ้าของสารละลาย} (\epsilon_s) = 80\epsilon_0$$

$$\text{สภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม} (\sigma_c) = 21 \text{ mS.m}^{-1}$$

$$\text{สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายภายนอก} (\sigma_s) = 20 \text{ mS.m}^{-1}$$

$$\text{สภาพนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์} (\sigma_m) = 80 \text{ } \mu\text{S.m}^{-1}$$

$$\text{ความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์} (\delta) = 15 \text{ nm}$$

$$\epsilon_0 \text{ สภาพยอมทางไฟฟ้าของสุญญากาศ} = 8.85 \times 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$$

$$\text{รัศมีเซลล์} (R) = 25 \text{ } \mu\text{m}$$

## ภาคผนวก 10

ตาราง 39 อัตราการดูดซึมฟอสเฟต ( $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ ) ของโพรโทพลาสต์

exposed time (min)	Count rate (cpm)				
	60 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	17 kV.m <sup>-1</sup>	control	Blank
1	148.63±5.38	159.29±1.42	169.21±2.50	147.86±3.02	48.41±4.22
3	138.94±4.24	168.88±2.64	160.91±10.02	158.22±9.14	68.74±6.44
5	116.98±3.53	131.52±7.17	162.81±12.81	154.94±7.06	76.50±9.57

ตาราง 40 เปรียบเทียบฟลักซ์ของโพรโทพลาสต์ที่เวลาในสนามไฟฟ้าต่างกัน

Induced time (min)	$\phi$ ( $\times 10^{-12}$ mol.h <sup>-1</sup> .cell <sup>-1</sup> )			
	60 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	17 kV.m <sup>-1</sup>	control
1	1.47±0.05	1.57±0.05	1.67±0.03	1.61±0.03
3	1.35±0.04	1.69±0.02	1.68±0.03	1.65±0.08
5	1.17±0.03	1.36±0.07	1.63±0.03	1.58±0.06

ตาราง 41 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า

Induced time (min)	Viability (%)			
	60 kV.m <sup>-1</sup>	45 kV.m <sup>-1</sup>	17 kV.m <sup>-1</sup>	control
1	81.64±4.04	86.16±3.01	88.01±8.55	88.72±4.70
3	70.18±8.79	89.23±2.58	87.78±1.66	
5	61.22±5.80	76.60±1.47	83.55±3.05	

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว กนกกานต์ มาศวิวัฒน์

วัน เดือน ปีเกิด 25 มีนาคม 2517

## วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การศึกษามัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-ฟิสิกส์)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒภาคใต้	2539

## ทุนการศึกษาและวิจัย

-ปีการศึกษา 2540 รับทุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

-ปีการศึกษา 2541-2542 รับทุนการศึกษาโครงการพัฒนาการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ในสถาบันราชภัฏ (พ.ว.ส.) จากสภาสถาบันราชภัฏ

## กระทรวงศึกษาธิการ

-ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์