

การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อศึกษาสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เดี่ยวใบสับปะรดภูเก็ตโดยวิธีไดอิเล็กโตรฟอเรซิส

สรวิณี บุญถวิล¹ ภูวดล บุตรรัตน์² และ มณีรัตน์ บุญล้ำ³

Abstract

Bunthawin, S., Butrat, P. and Boonlamp, M.

Development of a computer program to investigate electrical properties of Phuket pineapple leaf single cells by using dielectrophoresis

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2003, 25(2) : 227-237

This research developed a computer program to calculate electrical properties of a cell from a spherical single shell model. The program compared the results between the theoretical values ($\text{Re}[f(\omega)]_{TDS}$) and the experimental values ($\text{Re}[f(\omega)]_{EDS}$). The latter was computed from a cell velocity obtained from dielectrophoresis. The calculation was repeated until the error percentile was in a proper range. The program was applied to process the electrical properties of Phuket pineapple protoplasts [*Ananas comosus (L.) Merr.C.V. Phuket*]. It was found that the thickness of the cell membrane was 10 nm, the dielectric constants of suspending solution, cytoplasm and cell membrane were $80\epsilon_0$, $58-60\epsilon_0$ and $10-14\epsilon_0$ respectively (ϵ_0 is the dielectric constant of the vacuum = 8.85×10^{-12} F m⁻¹). The conductivity of cytoplasm and cell membrane were 0.09 S m⁻¹ and $10^{-5} - 10^{-4}$ S m⁻¹ respectively.

Key words : computer program, conductivity, dielectrophoresis, dielectric constant, Phuket pineapple, single-shell model

Phuket Community College, Prince of Songkla University, Phuket Campus, Kathu, Phuket 83120 Thailand.

¹วท.ม. (ฟิสิกส์) ²วท.ม. (พฤกษศาสตร์) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ³วท.ม. (วิทยาการคอมพิวเตอร์) วิทยาลัยชุมชนภูเก็ต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตภูเก็ต อำเภอกะทู้ จังหวัดภูเก็ต 83120

Corresponding e-mail : bsorawut@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 15 สิงหาคม 2545 รับลงพิมพ์ 20 ธันวาคม 2545

บทคัดย่อ

สรุติ บุญถวิล ภูวดล บุตรรัตน์ และ มณีรัตน์ บุญล้ำ
 การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อศึกษาสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เดี่ยว
 ไบสัปประตูกุ้งเกิดโดยวิธีไดอิเล็กโตรโฟเรซิส
 ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2546 25(2) : 227-237

ได้พัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับคำนวณค่าสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์ตามแบบจำลองเซลล์เดี่ยวทรงกลมเปลือกหนึ่งชั้น ด้วยวิธีเปรียบเทียบค่าที่คำนวณจากแบบจำลอง ($Re[f(\omega)]$) กับค่าที่คำนวณจากความเร็วของเซลล์เมื่อเกิดไดอิเล็กโตรโฟเรซิส ($Re[f(\omega)]_{EDS}$) แล้วทำซ้ำจนกระทั่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนอยู่ในระดับที่เหมาะสม เมื่อทดลองใช้โปรแกรมดังกล่าวกับโพรโทพลาสต์สัปประตูกุ้ง [*Ananas comosus (L.) Merr.C.V.Phuket*] พบว่าความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์ มีค่า 10 นาโนเมตร ค่าไดอิเล็กทริกของสารละลายแขวนลอย ของโพรโทพลาสซิม และของเยื่อหุ้มเซลล์ มีค่า $80\epsilon_0$ $58-60\epsilon_0$ และ $10-14\epsilon_0$ (เมื่อ ϵ_0 คือค่าไดอิเล็กทริกของสุญญากาศ มีค่า 8.85×10^{-12} ฟารัด.เมตร⁻¹) และสภาพนำไฟฟ้าของโพรโทพลาสซิมและของเยื่อหุ้มเซลล์มีค่า $\sigma_c = 0.09$ ซีเมนส์ เมตร⁻¹ และ $\sigma_m = 10^5 - 10^4$ ซีเมนส์ เมตร⁻¹ ตามลำดับ

เซลล์ชีวภาพจัดเป็นวัตถุที่เป็นกลางทางไฟฟ้า ไม่มีขั้วและเป็นวัสดุไดอิเล็กทริก (Scher, 1968) หากอยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าจากภายนอกในสภาวะที่เหมาะสม จะเกิดขั้วทางไฟฟ้าขึ้นภายในเซลล์ชั่วขณะ ทำให้เกิดแรงทางไฟฟ้ากระทำต่อเซลล์ให้เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่มีความเข้มสนามไฟฟ้าสูงกว่า เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ไดอิเล็กโตรโฟเรซิส (Dielectrophoresis, DEP) และเรียกแรงดังกล่าวว่า แรงไดอิเล็กโตรโฟเรติก (Pohl, 1978) มีผู้นำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เกาะกันเป็นคู่ เป็นกลุ่ม เป็นสายโซ่ และเคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วไฟฟ้า สำหรับการคัดแยกเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (Sudsiri et al., 1999) เป็นต้น ที่กล่าวมาข้างต้นต้องอาศัยความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับแบบจำลองทางไฟฟ้าของเซลล์ (electrical cell model) เพื่อใช้คำนวณสมบัติทางไฟฟ้า ได้แก่ ค่าสภาพนำไฟฟ้า (conductivity) และค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) ของเซลล์

มีนักวิจัยจำนวนมากได้ประมาณค่าสมบัติทางไฟฟ้า ด้วยวิธีไดอิเล็กโตรโฟเรซิส อาทิ Kaler and Jones (1990) ใช้ขั้วไฟฟ้าแบบกรวย-แผ่น (cone-plate) กับโพรโทพลาสต์ *Canola* โดยใช้แบบจำลองเซลล์เดี่ยวทรงกลมเปลือกหนึ่งชั้น (Spherical Single Shell Model, SSM) ในขณะที่ Mahaworasilpa et al. (1994) ใช้ขั้วไฟฟ้าแบบทรงกระบอกคู่ขนานกับเซลล์เม็ดเลือดคนและหนู และใช้แบบ

จำลอง SSM สมบัติทางไฟฟ้าที่ประมาณได้จากงานวิจัยเหล่านี้มีค่าแตกต่างกันขึ้นกับขนาด รูปทรง และองค์ประกอบของเซลล์แต่ละชนิด แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อด้อย ผู้วิจัยเลือกใช้หลักการเดียวกับ Mahaworasilpa et al. (1994) เพราะประหยัดค่าใช้จ่ายและเหมาะแก่การศึกษาเริ่มต้น แต่วิธีดังกล่าวต้องคำนวณส่วนจริงของฟังก์ชันเชิงซ้อน ($Re[f(\omega)]$) จากแบบจำลองตามสมการ

$$Re[f(\omega)] = -\left[\frac{AB+CD\omega^2}{B^2+D^2\omega^2} \right] \quad (1)$$

เพื่อเปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณจากความเร็ว $\vec{V}_{(DEP)}$ ในขณะเซลล์เกิดไดอิเล็กโตรโฟเรซิส ตามหลักแรงลากของ สโตกส์ (Stokes' drag force) ตามสมการ

$$Re[f(\omega)] = \frac{3\eta\vec{V}_{(DEP)}}{\epsilon_s R^2 \vec{\nabla}(\vec{E})^2} \quad (2)$$

เมื่อ A B C และ D มีค่าขึ้นกับสภาพนำไฟฟ้าของโพรโทพลาสซิม (σ_c) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (σ_m) และของสารละลายที่แขวนลอยเซลล์ (σ_s) ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของโพรโทพลาสซิม (ϵ_c) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (ϵ_m) และของสารละลายที่ใช้แขวนลอยเซลล์ (ϵ_s) รัศมีเซลล์ (R) ความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์ (δ) และความถี่สนามไฟฟ้าเชิงมุม (ω) สำหรับเทอม

$\vec{\nabla}(\vec{E})^2$ คืออัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มสนามไฟฟ้ากำลังสองเทียบกับระยะทาง มีค่าขึ้นกับขนาดและระยะห่างของขั้วไฟฟ้า และ η คือความหนืดของสารละลายที่ใช้แขวนลอยเซลล์

ด้วยเหตุที่ $Re[f(\omega)]$ มีค่าขึ้นกับพารามิเตอร์หลายตัว ยังผลให้เกิดความลำบากในการคำนวณและจำเป็นต้องอาศัยผู้ทดลองที่มีความรู้เกี่ยวกับแบบจำลองของเซลล์พอสมควร

งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับคำนวณค่าสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์ตามแบบจำลอง SSM อาศัยหลักการเปรียบเทียบค่า $Re[f(\omega)]$ ที่คำนวณจากสมการ (1) ($Re[f(\omega)]_{TDS}$) กับสมการ (2) ($Re[f(\omega)]_{EDS}$) แล้วทำซ้ำจนกระทั่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนอยู่ในระดับที่เหมาะสมตามสมการ

$$\left[\sum_{i=1}^n \sqrt{\left(\frac{(Re[f(\omega)]_{EDS})_i - (Re[f(\omega)]_{TDS})_i}{(Re[f(\omega)]_{EDS})_i} \right)^2} \right] \times \left(\frac{100}{n} \right) \quad (3)$$

เมื่อ $(Re[f(\omega)]_{EDS})_i$ และ $(Re[f(\omega)]_{TDS})_i$ คือค่า $Re[f(\omega)]$ ที่แต่ละค่าความถี่สนามไฟฟ้าที่ i ของสเปกตรัมไดอิเล็กโทรฟอเรซิสจากการทดลอง (EDS) และของสเปกตรัมไดอิเล็กโทรฟอเรซิสจากทฤษฎี (TDS) ทั้งหมดจำนวน n ค่า ตามลำดับ

ทดลองใช้โปรแกรมดังกล่าวกับโพทโทพลาสต์ สับปะรดภูเก็ต [*Ananas comosus (L.) Merr.C.V.P Phuket*] ซึ่งเป็นพืชเอกลักษณ์พื้นเมืองของจังหวัด ในช่วงความถี่สนามไฟฟ้าแบบกระแสสลับระหว่าง 10 กิโลเฮิร์ตซ์ - 30 เมกะเฮิร์ตซ์ ค่าคงที่ทางไฟฟ้าที่คำนวณ ได้แก่ σ_c σ_m ϵ_c ϵ_m และ δ ตามลำดับ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดภูเก็ต

ทำความสะอาดยอดอ่อนสับปะรดภูเก็ตด้วยน้ำสะอาดแล้วนำไปฆ่าเชื้อใน Clorox 20% เติมน้ำ Tween 20 1-2 หยด นาน 20 นาที แช่ใน Clorox 10% นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำมาผ่าแบ่งตายอดออกเป็น 4 ส่วน โดยให้ผ่านเนื้อเยื่อเจริญ ในตู้ถ่าย

เนื้อเยื่อ และเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS(1/2 macro, micro, iron) + BA 0.5 ppm วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100-110 รอบ นาที⁻¹ ภายใต้อุณหภูมิ 25-28°C ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมง วัน⁻¹ เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ ตายอดสับปะรดแต่ละส่วนจะเริ่มแตกหน่อย่อยตั้งแต่ 2 สัปดาห์แรกหลังการเพาะเลี้ยง ประมาณ 10 สัปดาห์จะเกิดหน่อย่อยเฉลี่ย 12 หน่อต่อตายอดแต่ละส่วน ความยาวหน่อประมาณ 1.5 ซม. จากนั้นนำมาแบ่งหน่อย่อยและเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเดิม จะได้ต้นอ่อนสับปะรดภูเก็ตจำนวนมาก จนต้นอ่อนสับปะรดอายุได้ 7 เดือน จะมีใบสมบูรณ์ แข็งแรง เจริญเต็มขนาดขนาด 8 ออนซ์

2. การเตรียมโพทโทพลาสต์สับปะรดภูเก็ต

สกัดโพทโทพลาสต์จากใบอ่อนของต้นอ่อนสับปะรดภูเก็ตด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ย่อย โดยเลือกใบอ่อนสับปะรดที่มีขนาดกว้างยาว ประมาณ 0.5x6 ซม. นำไปล้างน้ำสะอาดแล้วซับให้แห้ง ตัดปลายยอดออกประมาณ 2 ซม. แล้วนำไปซึ่งหาอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักใบต่อปริมาตรเอนไซม์ 1:10 หั่นใบเป็นแว่นเล็กๆ โดยใช้มีดหั่นตามแนวขวางใบเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการย่อย แล้วนำไปผสมกับเอนไซม์สูตร 1% cellulase + 0.5% driselase + 0.25% macerozyme + 0.6 M mannitol (ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย) ซึ่งเป็นของเหลวในจานเพาะเลี้ยง นำจานไปเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ นาที⁻¹ ที่อุณหภูมิประมาณ 25°C นาน 2-2.5 ชั่วโมง จนได้โพทโทพลาสต์สับปะรดที่มีลักษณะกลมใสรัศมีเซลล์ประมาณ 20-30 ไมครอน (Figure 1) จากนั้นทำการคัดแยกโพทโทพลาสต์ออกจากเศษเนื้อเยื่อด้วยวิธี sucrose gradient โดยใช้สารละลายซูโครสเข้มข้น 0.6 โมล บันแยกที่ความเร็ว 1,000 รอบ นาที⁻¹ นาน 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยสารละลายเดิมอีก 1 ครั้ง โดยบันแยกที่ความเร็ว 500 รอบ นาที⁻¹ นาน 5 นาที แล้วจึงนำไปแยกแขวนลอย 2 ชุด โพทโทพลาสต์ชุดที่ 1 แขวนลอยในสารละลายแมนนิทอลเข้มข้น 0.6 โมล ที่มีสภาพนำไฟฟ้า 50 มิลลิซีเมนส์ เมตร⁻¹ และโพทโทพลาสต์ชุดที่ 2 แขวนลอยในสารละลายเดียวกันที่มีสภาพนำไฟฟ้า 16 มิลลิซีเมนส์ เมตร⁻¹

วัดความหนืดของสารละลายแมนนิทอลดังกล่าวด้วยอุปกรณ์วัดความหนืด (viscometer) แบบหลอดรูปตัวยู

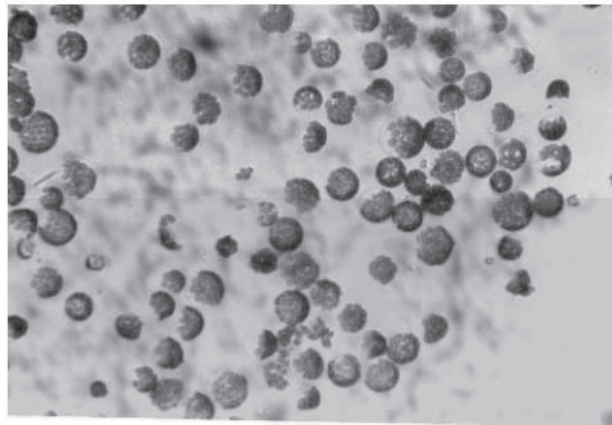


Figure 1. Phuket pineapple leaf protoplasts suspended in 0.6 molar mannitol. These protoplasts were approximately 20-30 μm in radius.

(Schcott Geratte U-tube, Germany) ที่อุณหภูมิประมาณ 25°C ได้ค่าความหนืด $\eta = 1.22$ มิลลินิวตัน.วินาที เมตร²

3. การเกิดไดอิเล็กโทรเรซิส

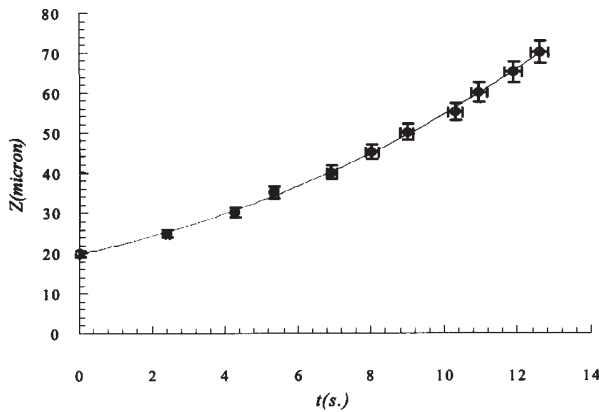
ใช้ขั้วไฟฟ้า निकเกิล-อัลลอย แบบทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 ไมครอน วางคู่ขนานห่างกันเป็นระยะ $d = 250$ ไมครอน จุ่มลงในภาชนะที่มีโพรโทพลาสต์แขวนลอยอยู่ในสารละลายแมนนิทอลที่ปรับสภาพนำไฟฟ้าแล้วจัดให้ขั้วไฟฟ้างอตัววางคร่อมโพรโทพลาสต์เดี่ยวให้ลอยอยู่ในตำแหน่งกึ่งกลางตาม Wanichapichart *et al.* (2002) ต่อเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ (Standford Research System, DS345 30 MHz, USA) แบบวงจรขนานกับขั้วไฟฟ้า ใช้ศักย์ไฟฟ้า V ขนาด $7 V_{p-p}$ (วัดจากยอดบนสุดถึงล่างสุดของสัญญาณ) ได้ความเข้มสนาม (E) ประมาณ 35-40 กิโลโวลต์ เมตร⁻¹ ใช้ความถี่ f เริ่มต้นที่ 30 เมกกะเฮิร์ตซ์ แล้วลดค่าลงครึ่งละ 1 เมกกะเฮิร์ตซ์ จนกระทั่งถึงความถี่ในระดับกิโลเฮิร์ตซ์จึงลดค่าลงครึ่งละ 1 กิโลเฮิร์ตซ์ บันทึกภาพการเกิดไดอิเล็กโทรเรซิสของโพรโทพลาสต์ขณะเคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วไฟฟ้าที่แต่ละความถี่ดังกล่าวลงในม้วนวีดีโอด้วยกล้อง Digital camera (Sony, CCD-IRIS, Japan) ทดลองโดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Olympus, LX 700, Japan) กำลังขยาย 400 เท่า ทดลองซ้ำแบบเดิมที่ความถี่เดิม 3 ครั้งกับเซลล์ใหม่จากโพรโทพลาสต์ชุดที่ 1 และโพรโทพลาสต์ชุดที่ 2

ความเร็วไดอิเล็กโทรเรติก

วัดความเร็วการเคลื่อนที่ของโพรโทพลาสต์จากภาพวีดีโอที่ปรากฏบนจอคอมพิวเตอร์โททัศน์สี (Mitsubishi CT-29K1SB) โดยการเลนภาพซ้ำย้อนกลับไป-มาเพื่อบันทึกตำแหน่งและระยะขจัดที่เซลล์ใช้ในการเคลื่อนที่เข้าเกาะขั้วไฟฟ้า นำข้อมูลมาพลอตกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ถดถอยแบบไม่เชิงเส้น ได้ฟังก์ชันระยะขจัดขึ้นกับเวลา $Z(t)$ แล้วอนุพันธ์ (differentiation) เทียบกับเวลา t หนึ่งครั้งเพื่อหาฟังก์ชันความเร็ว $v(t)$ แทนค่าเวลากลับลงในฟังก์ชันจะได้ค่าความเร็วไดอิเล็กโทรเรติก (\bar{U}_{DEP}) (Figure 2) นำความเร็วดังกล่าวไปคำนวณค่า $(\text{Re}[f(\omega)]_{EDS})_i$ ตามสมการ (2)

4. โปรแกรมคอมพิวเตอร์คำนวณค่าคงที่ทางไฟฟ้าและสมบัติไดอิเล็กทริก

เขียนโปรแกรมจำลองกระบวนการประมาณค่าคงที่ทางไฟฟ้าและสมบัติไดอิเล็กทริกตามแบบจำลอง SSM ลงบนไมโครคอมพิวเตอร์ (Microchip, RAM 128 MB, CPU Pentium 800 MHz, HDD 20 GB, Taiwan) ตามแผนภาพ (Figure 3) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป *Clipper Version 5.0* โดยแบ่งโปรแกรมเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วน *Application* ใช้เนื้อที่หน่วยความจำ 276 KB ส่วน *DBF* ใช้เนื้อที่หน่วยความจำ 91.466 KB และส่วน *Text Document* ใช้เนื้อที่หน่วยความจำ 320 KB รวมเนื้อที่



$$Z(t) = 0.0027t^3 + 0.1265t^2 + 1.9182t + 19.846(\text{micron})$$

$$v(t) = \frac{dZ(t)}{dt} = 0.0081t^2 + 0.2530t + 1.9182 (\text{micron}\cdot\text{s}^{-1})$$

Figure 2. An example of plots of cell displacement (z) as a function of time (t) for the pro-toplast, suspend in 0.6 M mannitol ($\sigma_s = 50 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$).

หน่วยความจำทั้งหมดประมาณ 688 KB สำหรับส่วน Application จะกำหนดค่าพารามิเตอร์เริ่มต้นเพื่อกระบวนการทำซ้ำ ได้แก่ $\sigma_c, \sigma_m, \sigma_s, \epsilon_c, \epsilon_m, \epsilon_s, R, \delta$ และ f อิงค่าเหล่านี้กับงานวิจัยอื่น อาทิ Fuhr and Kuzmin (1986) Kaler and Jones (1990) Mahaworasilpa *et al.* (1994) และ Radu *et al.* (1996) โปรแกรมจะนำค่าเหล่านี้ไปคำนวณค่า $(\text{Re}[f(\omega)]_{TDS})_i$ เพื่อเปรียบเทียบกับค่า $(\text{Re}[f(\omega)]_{EDS})_i$ ที่แต่ละค่าที่ i ($i=1-n, n=20$) จนครบทุกค่า แล้วทำซ้ำจนกระทั่งได้ค่าเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนตามที่กำหนดและเหมาะสม ปกติแล้วไม่ควรเกิน 30% (คำนวณจากสมการ 3) ในกระบวนการทำซ้ำแต่ละครั้ง โปรแกรมจะปรับเปลี่ยนค่าพารามิเตอร์แต่ละตัวอย่างต่อเนื่องแบบอัตโนมัติเพื่อใช้ในการคำนวณรอบถัดไป เรียกค่าความแตกต่างของพารามิเตอร์ก่อนและหลังปรับเปลี่ยนว่า "Range" อาศัยหลักการวิเคราะห์ความไวของพารามิเตอร์แต่ละตัวต่อสเปกตรัมไดอิเล็กโทรฟอเรซิสตาม Mahaworasilpa *et al.* (1994) เพื่อกำหนดลำดับขั้นในการปรับเปลี่ยนค่า งานวิจัยนี้เรียงลำดับก่อนหลังดังนี้ $\sigma_c, \sigma_m, \epsilon_c, \epsilon_m$ และ δ ตามลำดับ นอกจากนี้ โปรแกรมดังกล่าวจะแสดงเวลาในการคำนวณทั้งหมดตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการ

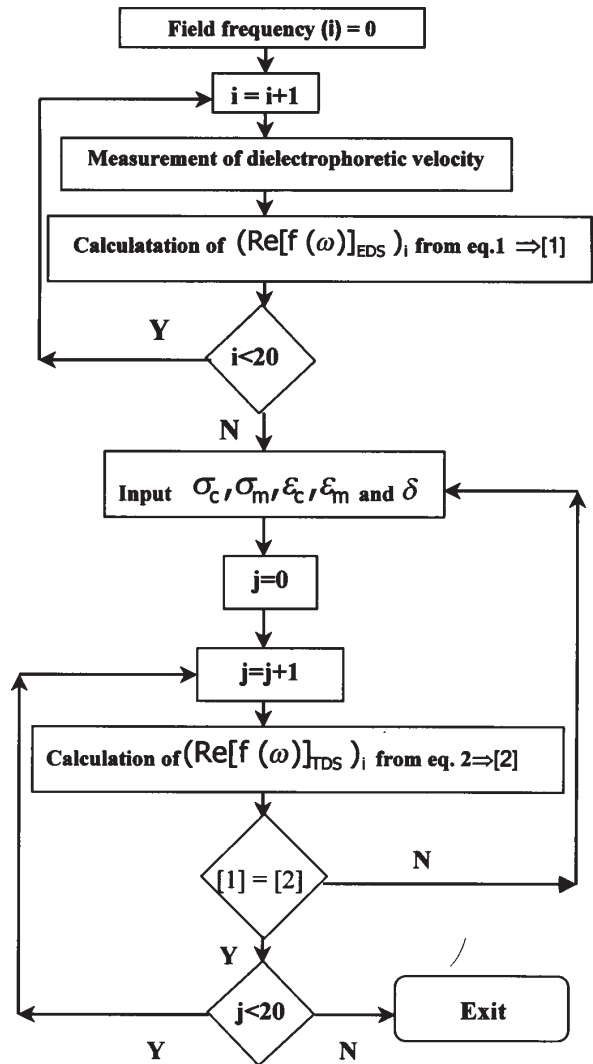


Figure 3. The calculation of the values of $\sigma_c, \sigma_m, \epsilon_c, \epsilon_m$ and δ on the Clipper program.

คำนวณ (ค่าละเอียดสุดในหน่วยวินาที) และแสดงจำนวนผลเฉลยทั้งหมด (ค่าสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์) ที่อยู่ในช่วงเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนที่กำหนด

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความเร็วไดอิเล็กโทรฟอเรติก และ EDS

เมื่อโพทโทพลาสต์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดไดโพล จะเคลื่อนที่จากตำแหน่ง $z = 0$ ตามแนวแรงสนามไฟฟ้าเข้า

เกาะขั้วไฟฟ้า กรณีทดลองกับโปรโทพลาสต์ชุดที่ 1 ความเร็วต่ำสุดที่วัดได้มีค่า 1.6 ไมครอน วินาที⁻¹ ที่ความถี่ 200 กิโลเฮิร์ตซ์ และความเร็วสูงสุดที่วัดได้มีค่า 21.2 ไมครอน วินาที⁻¹ ที่ความถี่ 3 เมกกะเฮิร์ตซ์ ช่วงความถี่ที่เกิดไดโพลีโทรฟอเรซิสมีค่าอยู่ในช่วง 100 กิโลเฮิร์ตซ์ ถึง 30 เมกกะเฮิร์ตซ์ ($f_0(EDS) = 100$ กิโลเฮิร์ตซ์ และ $f_{\infty}(EDS) = 30$ เมกกะเฮิร์ตซ์) เมื่อพลอตกราฟความเร็วเทียบกับความถี่ พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นโค้งคว่ำ (Figure 4) มีจุดวกกลับหนึ่งจุด จุดดังกล่าวคือค่าความเร็วสูงสุด และเมื่อพลอตกราฟ EDS พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นโค้งคว่ำเช่นกัน (Figure 5) มีจุดวกกลับหนึ่งจุด คำนวนค่า $Re[f(\omega)]_{EDS}$ พบว่ามีค่าสูงสุด 0.17 ที่ความถี่ 3 เมกกะเฮิร์ตซ์

สำหรับกรณีทดลองกับโปรโทพลาสต์ชุดที่ 2 ความเร็วต่ำสุดที่วัดได้มีค่า 13.3 ไมครอน วินาที⁻¹ ที่ความถี่ 50 กิโลเฮิร์ตซ์ และความเร็วสูงสุดที่วัดได้มีค่า 69.6 ไมครอน วินาที⁻¹ ที่ความถี่ 8 เมกกะเฮิร์ตซ์ และ 900 กิโลเฮิร์ตซ์ ตามลำดับ ช่วงความถี่ที่เกิดไดโพลีโทรฟอเรซิสมีค่าอยู่ในช่วง 40 กิโลเฮิร์ตซ์ ถึง 10 เมกกะเฮิร์ตซ์ ($f_0(EDS) = 40$ กิโลเฮิร์ตซ์ และ $f_{\infty}(EDS) = 10$ เมกกะเฮิร์ตซ์) เมื่อพลอตกราฟความเร็วเทียบกับความถี่ พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นโค้งคว่ำ (Figure 6) มีจุดวกกลับหนึ่งจุด จุดดังกล่าวคือค่าความเร็วสูงสุด และเมื่อพลอตกราฟ EDS พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นโค้งคว่ำคล้ายกับการทดลองชุดที่ 1 (Figure 7) ให้ค่าสูงสุดสองค่า เมื่อคำนวณค่า $Re[f(\omega)]_{EDS}$ พบว่ามีค่า

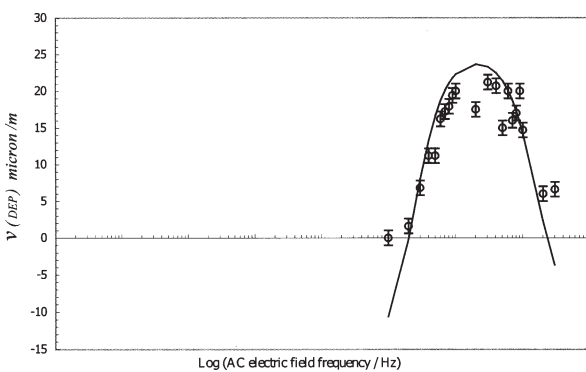


Figure 4. Theoretical (solid line) and experimental values (O) of v_{DEP} versus field frequency for protoplasts, suspended in 0.6 M mannitol ($\sigma_s = 50 \text{ mS.m}^{-1}$).

สูงสุด 0.55 ที่ความถี่ 8 เมกกะเฮิร์ตซ์ และ 900 กิโลเฮิร์ตซ์ ตามลำดับ

เป็นที่สังเกตว่า ความเร็วไดโพลีโทรฟอเรติกของทั้งสองชุดทดลองมีแนวโน้มคล้ายกัน กล่าวคือ ที่ความถี่ย่านต่ำ ความเร็วจะมีค่าน้อยและจะค่อยๆ เพิ่มค่าขึ้นตามความถี่จนกระทั่งถึงค่าความถี่ย่านกลางระดับเมกกะเฮิร์ตซ์ ความเร็วจะมีค่าสูงสุด จากนั้นจะค่อยๆ ลดค่าลงเมื่อความถี่สูงขึ้น ความเร็วไดโพลีโทรฟอเรติกโดยเฉลี่ยของโปรโทพลาสต์ชุดที่ 2 มีค่าสูงกว่าของชุดที่ 1 ส่งผลให้แอมพลิจูด

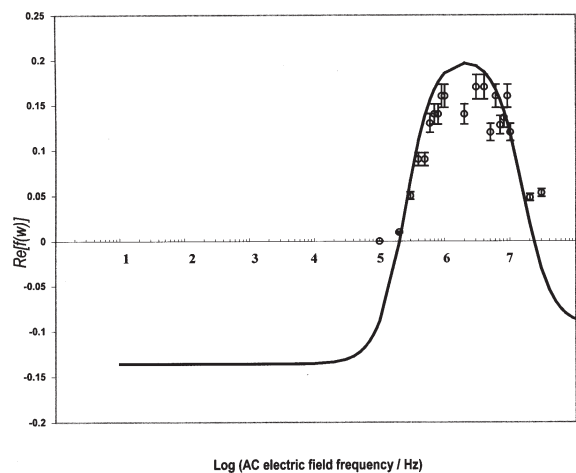


Figure 5. Theoretical (solid line) and experimental values (O) of $Re[f(\omega)]$ versus field frequency for protoplast, suspended in 0.6 M mannitol ($\sigma_s = 50 \text{ mS.m}^{-1}$).

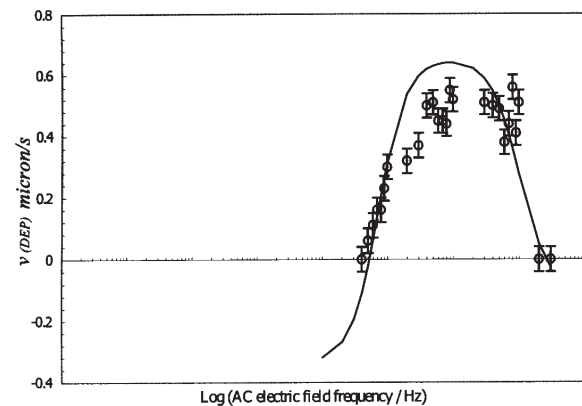


Figure 6. Theoretical (solid line) and experimental values (O) of v_{DEP} versus field frequency for protoplasts, suspended in 0.6 M mannitol ($\sigma_s = 16 \text{ mS.m}^{-1}$).

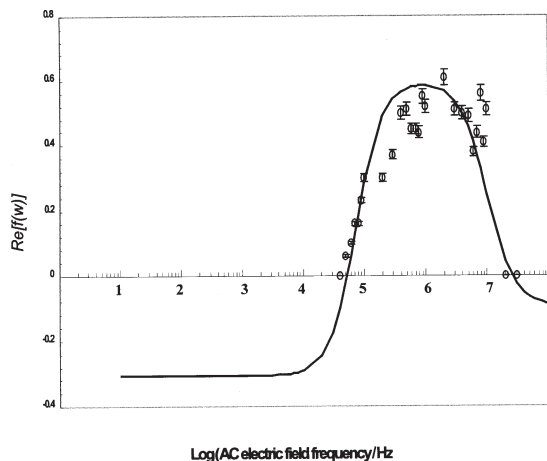


Figure 7. Theoretical (solid line) and experimental values (O) of $Re[f(\omega)]$ versus field frequency for protoplast, suspended in 0.6 M mannitol ($\sigma_s = 16 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$).

ของสเปกตรัมไดโอดีโทโพเรซิสของทั้งสองชุดมีค่าต่างกันประมาณ 3 เท่า นอกจากนี้พบว่า ค่า $f_0(\text{EDS})$ และค่า $f_{\infty}(\text{EDS})$ ของโพโรโทพลาสต์ชุดที่ 1 มีค่าสูงกว่าของโพโรโทพลาสต์ชุดที่ 2 กล่าวโดยสรุป พบว่าความเร็วไดโอดีโทโพเรติกโดยเฉลี่ยของโพโรโทพลาสต์ที่แขวนลอยในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้าที่ต่ำกว่าจะมีค่าสูงกว่า และถ้าสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายที่แขวนลอยเซลล์มีค่าสูงขึ้น จะมีแนวโน้มทำให้ขอบเขตช่วงความถี่ไดโอดีโทโพเรซิสขยับไปที่ความถี่สูงขึ้นด้วย สอดคล้องตามงานวิจัยที่ Mahaworasilpa *et al.* 1994 ได้รายงานไว้

2. โปรแกรมคำนวณค่าคงที่ทางไฟฟ้าและสมบัติไดโอดีโทริก

ผลจากการใช้โปรแกรมพบว่า ในการคำนวณสมบัติทางไฟฟ้าใช้เวลาเพียงเล็กน้อยในช่วงประมาณ 2-180 วินาที (นับจากเวลาที่โปรแกรมเริ่มทำงาน) ทั้งนี้ขึ้นกับความเร็วของหน่วยประมวลผลคอมพิวเตอร์ ค่า Range รวมถึงการกำหนดค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดและค่าสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เริ่มต้น กล่าวเป็นลำดับดังนี้คือ ถ้ากำหนดค่า Range ให้มีค่าน้อยจะใช้เวลาคำนวณนาน ทั้งนี้เพราะในแต่ละรอบการทำงาน ค่าพารามิเตอร์ที่เปลี่ยนไปที่ละน้อยจะส่งผลให้โปรแกรมต้องทำงานซ้ำด้วยจำนวนรอบ

มากขึ้น ซึ่งเป็นผลดีต่อการคำนวณเพราะค่าพารามิเตอร์ที่คำนวณได้จะมีแนวโน้มให้ค่าที่ใกล้เคียงกับผลเฉลยมากยิ่งขึ้น และในทางกลับกันจะเป็นไปในทางตรงกันข้าม ในกรณีที่กำหนดค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดน้อย จะใช้เวลาคำนวณนานเช่นกัน เพราะโดยปกติค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดเริ่มต้นก่อนที่การทำงานซ้ำจะเกิดขึ้นมักมีค่าสูงอยู่ก่อนแล้ว หากจะทำให้ค่าดังกล่าวลดน้อยลงต้องใช้เวลา เพราะโปรแกรมต้องทำงานซ้ำด้วยจำนวนรอบมากขึ้น ค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดที่น้อยเป็นผลดีเพราะผลการคำนวณจะมีความแม่นยำสูง นอกจากนี้ หากกำหนดค่าสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เริ่มต้นที่มีค่าห่างจากความเป็นจริงมาก จะใช้เวลาคำนวณนานขึ้นเช่นกัน

โดยปกติการกำหนดค่า Range ของพารามิเตอร์แต่ละตัวมีค่าต่างกันและมีขีดจำกัด คำนึงตามความเหมาะสม อาทิ ค่า Range ของค่าไดโอดีโทริกควรจะมีค่าเป็นจำนวนเท่าของค่าไดโอดีโทริกของสูญญากาศ และค่า Range ของสภาพนำไฟฟ้าควรจะมีค่าที่เป็นจำนวนจุดทศนิยมน้อยจุดเป็นเลขของตัว ทำนองเดียวกันกับการกำหนดค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดและค่าสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เริ่มต้น โดยปกติควรกำหนดให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดมีค่าน้อยไว้ก่อน หากผลการคำนวณไม่สอดคล้องกับค่าเปอร์เซ็นต์ที่กำหนด จึงค่อยเพิ่มค่าขึ้น ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้กำหนดช่วงการยอมรับค่าไว้ที่ไม่เกิน 30% อย่างไรก็ตาม โปรแกรมคำนวณที่ใช้ในงานวิจัยนี้ สามารถปรับเปลี่ยนค่า Range และค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดได้เป็นช่วงเปิดขึ้นกับผู้ทดลองใช้ หากกำหนดค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดให้มีค่าเท่ากับศูนย์ย่อมเป็นผลดี เพราะนั่นหมายถึงผลการคำนวณจะมีทั้งความแม่นยำและความเที่ยงตรงสูงในอุดมคติ แต่ในทางปฏิบัติ ยังไม่สามารถทำให้เกิดผลเช่นนั้นได้ และอาจทำให้โปรแกรมคำนวณช้าไม่รู้จบยังผลให้โปรแกรมหยุดการทำงาน นอกจากนี้ การบ่อนค่า $(Re[f(\omega)]_{EDS})_i$ ให้แก่โปรแกรมควรคำนึงถึงการกระจายของข้อมูลให้ครอบคลุมทุกย่านความถี่ที่ทดลองตั้งแต่ย่านความถี่ต่ำสุด ย่านกลาง จนถึงย่านสูงสุด โดยเฉพาะที่ $f_0(\text{EDS})$ และ $f_{\infty}(\text{EDS})$ เพราะเป็นความถี่ที่กำหนดช่วงการเกิดไดโอดีโทโพเรซิสแบบบวก

อย่างไรก็ดี ไม่ว่าผู้ทดลองใช้โปรแกรมจะคำนึงถึงหลักการดังกล่าวข้างต้นหรือไม่ จะไม่ส่งผลต่อความเที่ยง

ตรงของผลการคำนวณ แต่อาจส่งผลต่อเวลาที่ใช้คำนวณเพียงเล็กน้อย เมื่อตรวจสอบผลลัพธ์ที่คำนวณได้จากโปรแกรม พบว่ามีค่าตรงกับวิธีประมาณแบบ Mahaworasilpa et al. (1994) แต่วิธีใหม่นี้ใช้เวลารวมในการคำนวณ

ทั้งหมดรวดเร็วกว่าประมาณ 20-1800 เท่า เมื่อกระบวนการทำซ้ำสิ้นสุดลงจะแสดงค่าสมบัติทางไฟฟ้าตามลักษณะหน้าจอ Figure 8

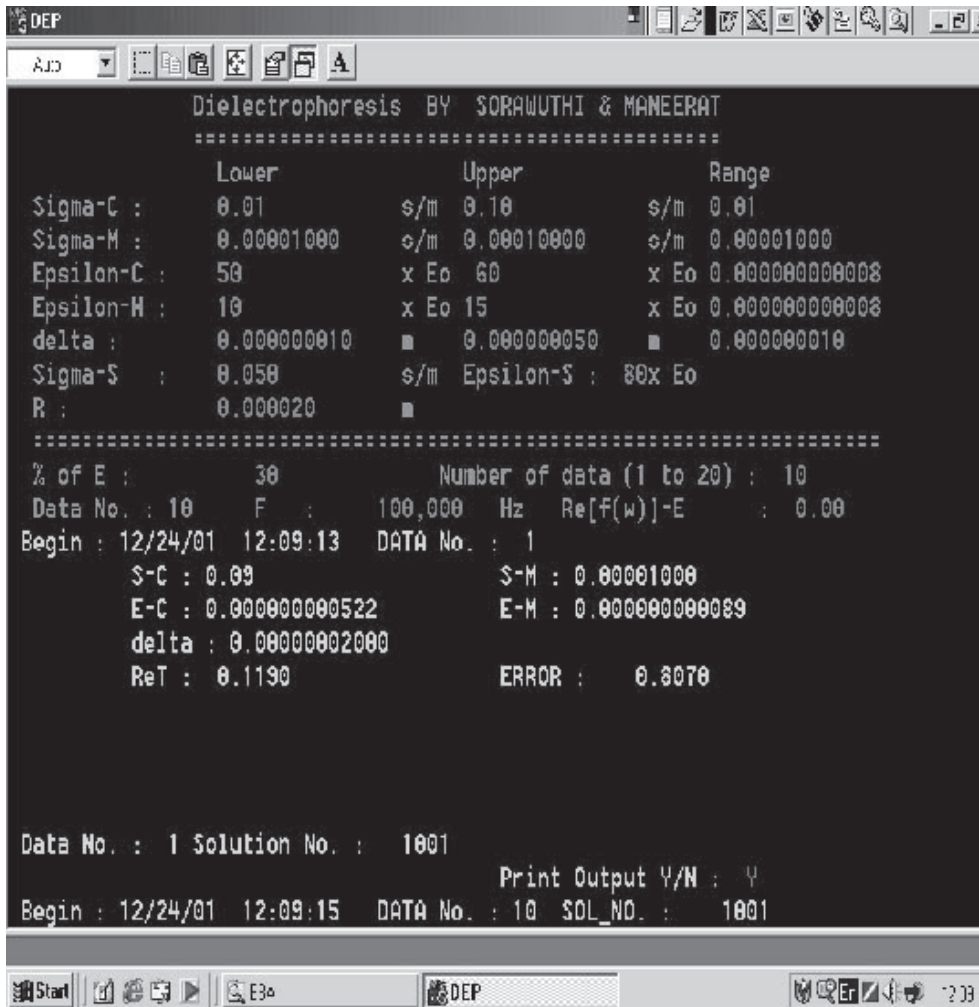


Figure 8. An example of simulation of the calculating process by Clipper program on micro-computer to compile each electrical parameter.

These values are

S-C = $\sigma_s = 0.09$ S/m

S-M = $\sigma_m = 10^{-5}$ S/m

E-C = $\epsilon_c = 522 \times 10^{-12}$ F/m = $58 \epsilon_0$

E-M = $\epsilon_m = 86 \times 10^{-12}$ F/m = $10.05 \epsilon_0$

delta = $\delta = 20$ nm ReT = Re[f(ω)] (theoretical)

running time 2 seconds

ERROR = 8%.

3. ผลการคำนวณค่าสมบัติทางไฟฟ้า

ผลการคำนวณค่าสมบัติไดอิเล็กทริกของโพโรโท-
พลาสต์ทั้งสองชุดทดลองมีค่าตรงกันดังนี้

ความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์ $\delta = 10$ นาโนเมตร

ค่าไดอิเล็กทริกของไซโทพลาสซึม $\epsilon_c = 60\epsilon_0$

ค่าไดอิเล็กทริกของเยื่อหุ้มเซลล์ $\epsilon_m = 14\epsilon_0$

สภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึม $\sigma_c = 0.09$ ซีเมนส์
เมตร⁻¹

สภาพนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ $\sigma_m = 10^{-5} - 10^{-4}$
ซีเมนส์ เมตร⁻¹

เมื่อพิจารณาค่าเหล่านี้กับงานวิจัยอื่น อาทิ Kaler
and Jones (1990) Fuhr and Kuzmin (1986) Radu *et al.*
(1996) และ Mahaworasilpa *et al.* (1994) พบว่า
ค่า δ ของเซลล์พืชทั่วไปจะมีค่าอยู่ในช่วง 8-10 นาโนเมตร
ค่า ϵ_c จะมีค่าอยู่ในช่วง $50-80\epsilon_0$ ค่า ϵ_m จะมีค่าอยู่ในช่วง
 $3-9\epsilon_0$ ค่า σ_c จะมีค่าอยู่ในช่วง 0.1-5 ซีเมนส์ เมตร⁻¹ และ

Table 1. Electric parameters of *Canola leaves, Beta vulgaris, Yeast cells red blood cells and Phuket pineapple protoplast.*

Cell/size/f (Hz)	Parameters									
	σ_c	σ_m	σ_w (S.m ⁻¹)	ϵ_c	ϵ_m	ϵ_s (ϵ_0)	ϵ_w	δ	δ_w (nm)	
<i>Plant; Beta vulgaris</i> R = 30 μ m 100 Hz - 3 MHz	5	10^{-6}	0.05	80	9	80	70	10	1,000	
DSM <i>Fuhr and Kuzmin (1986)</i>										
<i>Plant protoplast;</i> <i>Canola leaves</i> R = 17.5 μ m/ 1 kHz - 50 MHz	0.5	-	-	60	5	80	-	10	-	
SSM <i>Kaler and Jones (1990)</i>										
<i>Red blood cells</i> 10 μ m 10 kHz - 2 MHz	0.12	10^{-7}	-	60	3	78	-	10	-	
SSM <i>Mahaworasilpa et al. (1994)</i>										
<i>Yeast cells;</i> <i>Saccharomyces</i> / 2.5 \times 6 μ m 1 kHz - 1 MHz	0.2	5×10^{-7}	0.01	50	6	80	60	80	200	
ESM <i>Radu et al. (1996)</i>										
<i>Phuket pineapple</i> <i>protoplast</i> 20 μ m 1 kHz - 30 MHz	0.09	10^{-5}	-	60	14	-	-	10	-	
SSM <i>Bunthawin et al. (2003)</i>										

Note: Subscript *w* mean cell wall

ค่า σ_m จะมีค่าอยู่ในช่วง $10^{-7} - 10^{-6}$ ซีเมนส์ เมตร⁻¹ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเหล่านี้กับงานวิจัยพบว่า ค่า δ และ ϵ_c ของโพรโทพลาสต์สับปรดฎเกิดอยู่ในเกณฑ์ปกติสำหรับค่า ϵ_m และ σ_m ใกล้เคียงกับเกณฑ์ แต่ σ_c มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ประมาณ 1-55.6 เท่า ยังเป็นที่คลงแคลงว่าค่า σ_c ควรจะสอดคล้องกับกลุ่มเซลล์พืชทั่วไป แต่กลับมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและหนู ($\sigma_c = 0.12$ ซีเมนส์ เมตร⁻¹) (Table 1) อาจเป็นไปได้ว่า องค์ประกอบของของเหลวภายในเซลล์สับปรดฎมีปริมาณไอออนที่แตกต่างจากเซลล์พืชทั่วไป เพราะในสภาวะปกติ โพรโทพลาสซึมจะมีสภาพนำไฟฟ้าที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ (Bernstien, 1902) เนื่องจากภายในเซลล์มีกลไกที่จะพยายามรักษาระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไอออน รวมทั้งไอออนชนิดอื่นๆ อาทิ โซเดียมและคลอไรด์ไอออน ในปริมาณที่สูงพอเพียงต่อการดำรงชีวิตของเซลล์แต่ถึงอย่างไร พารามิเตอร์เหล่านี้ยังคงมีค่าสอดคล้องกับหลักการเกิดไดโพลในช่วงความถี่สนามไฟฟ้าย่านกลางตามที่ Schwan (1988) ได้รายงานไว้ กล่าวคือ ค่า ϵ_c จะมีค่าสูงกว่า ϵ_m และค่า σ_c จะมีค่าสูงกว่า σ_r และ σ_m เสมอ

สรุป

โปรแกรมคำนวณที่นำเสนอในงานวิจัยนี้ สามารถใช้คำนวณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เดี่ยวตามแบบจำลอง SSM ค่าสมบัติทางไฟฟ้าจะปรากฏเป็นตัวเลขเมื่อกระบวนการทำซ้ำสิ้นสุดลง โปรแกรมดังกล่าวมีความสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ ผู้ใช้งานไม่จำเป็นต้องมีความรู้ความชำนาญเกี่ยวกับแบบจำลองของเซลล์ สามารถติดตั้งโปรแกรมดังกล่าวได้กับไมโครคอมพิวเตอร์ที่มี CPU ตั้งแต่ 486 ขึ้นไป เมื่อนำมาทดลองใช้กับโพรโทพลาสต์สับปรดฎเกิดพบว่า พารามิเตอร์ส่วนใหญ่มีค่าสอดคล้องและใกล้เคียงกับเซลล์ชนิดอื่นๆ ยกเว้นค่า σ_c ซึ่งมีค่าน้อยกว่าปกติเมื่อเทียบกับข้อมูลจากเซลล์พืชทั่วไป อาจเป็นไปได้ว่า ความแตกต่างนี้แสดงถึงเอกลักษณ์เฉพาะของโพรโทพลาสต์สับปรดฎเกิด

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนจากเงินรายได้ ประเภทพัฒนานักวิจัย ประจำปี 2543 ขอขอบคุณ วิทยาลัยชุมชนภูเก็ต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุญาตให้ใช้เวลา สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิกุล วนิชชาติ หน่วยวิจัยชีวฟิสิกส์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เมมเบรน ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ รศ.ดร.คำคุณ กามัญภุมิ ห้องวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอย่างสูงที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านอุปกรณ์บันทึกผลการทดลอง ขอขอบคุณ อาจารย์ชุตินา ต่อเจริญ วิทยาลัยชุมชนภูเก็ต สำหรับความช่วยเหลือเรื่องคณิตศาสตร์ในงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณธเนศ สินธุ์ประจิม หน่วยวิจัยชีวฟิสิกส์ และคุณนภาพร นาคอุดม ห้องวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- Bernstein, J. 1902. Untersuchungen zur thermodynamik der bioelektrischen strome; 1(Erster Theil). Journal of Arch. Ges. Physiol., 92: 521-562.
- Fuhr, G. and Kuzmin P.I. 1986. Behaviour of cells in rotating electric fields with account to surface charges and cell structures. Journal of Biophysics, 50: 789-795.
- Kaler, K.V.I.S. and Jones, T.B. 1990. Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitation. Journal of Biophysics, 57: 173-182.
- Mahaworasilpa, T., Coster, H.G.L. and George, E.P. 1994. Force on biological cells due to applied (AC) electric fields. I. Dielectrophoresis. Journal of Biochimica et Biophysica Acta, 1193: 118-126.
- Pohl, H.A. 1978. Dielectrophoresis. Cambridge University. London.

- Radu, M. Petcu, I., Sommer, A. and Avram, D. 1996. Change in membrane electrical parameters of yeast following chemical treatment for protoplast isolation. *Journal of Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40: 79-98.
- Scher, L.D. 1968. Dielectrophoresis in lossy dielectric media. *Nature*, 220: 695-696.
- Schwan, H.P. 1988. Dielectric spectroscopy and electro-rotation of biological cells. *Journal of Ferroelectrics*, 86: 205-223.
- Sudsiri, J., Wanichapichart, P., Mahaworasilpa, T. and Coster, H.G.L. 1999. AC electric field frequencies for isolating five marine phytoplanktons. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 21(2): 213-219.
- Wanichapichart, P., Bunthawin, S., Kaewpaiboon, A. and Kanchanapoom, K. 2002. Determination of cell dielectric properties using dielectrophoretic technique. *Journal of Science Asia*, 28: 113-119.