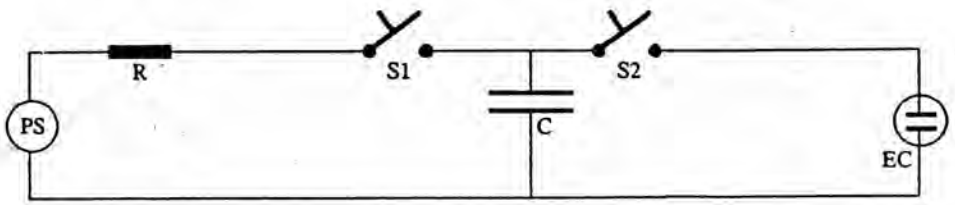
บทที่ 3
ระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation apparatus) และการศึกษาความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่เกิดในภาวะที่มีสารละลายอิเล็กโทรไลท์ ชนิดต่าง ๆ

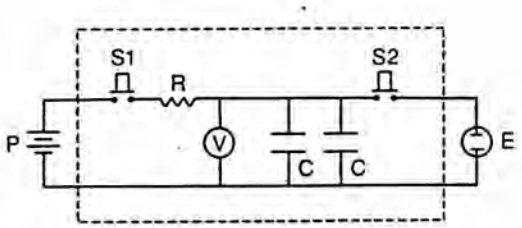
ในบทนี้จะกล่าวถึงระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่สร้างขึ้นและการศึกษาความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่เกิดขึ้นในภาวะที่มีสารละลายอิเล็กโทรไลท์ชนิดต่างๆ อิเล็กโทรพอเรชันเป็นกระบวนการทางไบโอฟิสิกส์ (Biophysical) โดยใช้สนามไฟฟ้าความเข้มสูง เวลาสั้น ๆ ทำให้เกิดการซึมผ่านได้เพิ่มขึ้นของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเกิดขึ้นชั่วคราว เพราะฉะนั้นปัจจัยทางไฟฟ้าจึงเป็นตัวแปรที่สำคัญในการทดลอง หลักการเบื้องต้นในการประดิษฐ์เครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Chassy, Saunders and Sower, 1992 cited by Chang et al. 1992) ที่ควรคำนึงถึงก็คือสนามไฟฟ้าและเวลา

จากพื้นฐานความรู้ทางไฟฟ้ารวมกับความรู้ทางด้านชีววิทยาได้ก่อให้เกิดการประดิษฐ์วงจรไฟฟ้าที่ใช้งานกับกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) จากนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ดังรูปที่ 3.1 - 3.7



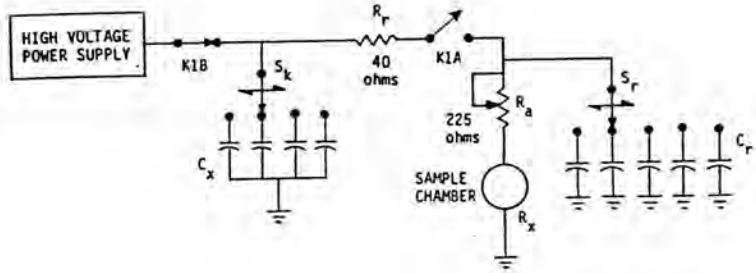
รูปที่ 3.1 ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ก

ที่มา : Fromm และคณะ (1985)



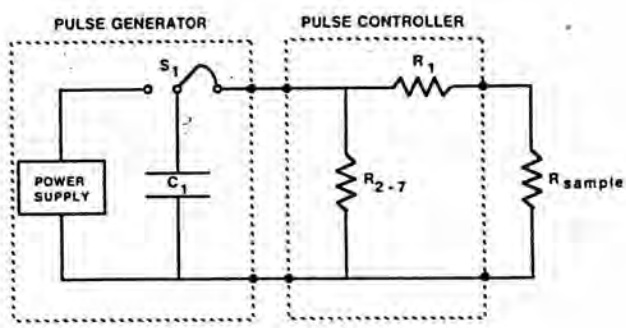
รูปที่ 3.2 ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ข

ที่มา : Chu, Hayakawa และ Berg (1987)



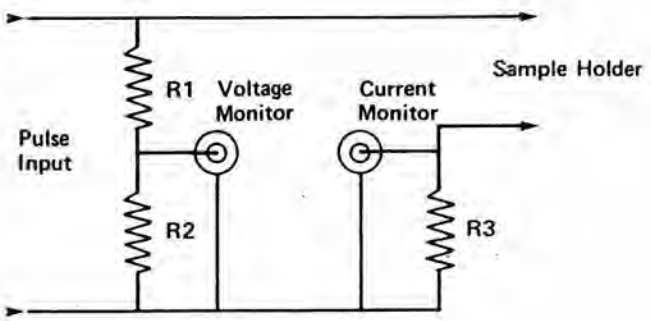
รูปที่ 3.3 ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ค

ที่มา : Knutson และ Yee (1987)



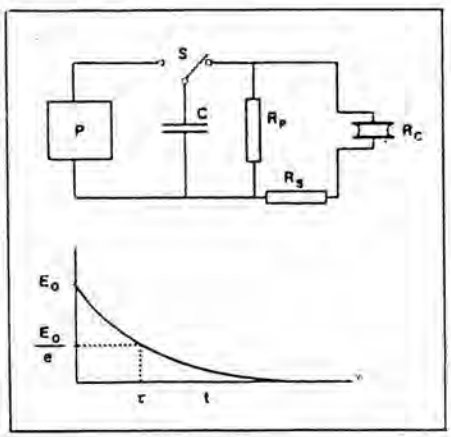
รูปที่ 3.4 ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ง

ที่มา : Dower และคณะ (1988)



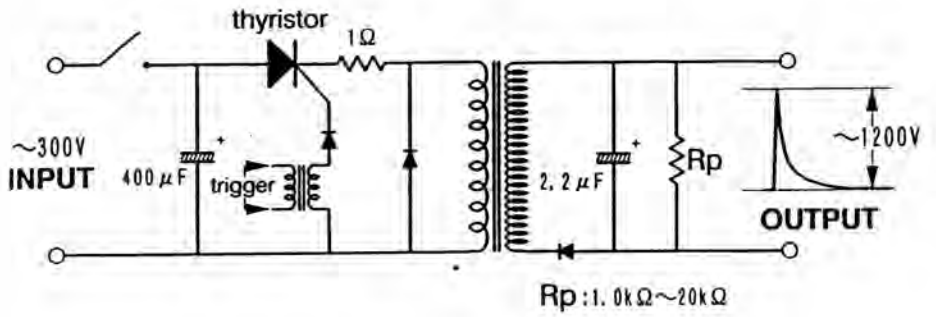
รูปที่ 3.5 ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน จ

ที่มา : Calvin และ Hanawalt (1988)



รูปที่ 3.6 ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ฉ

ที่มา : Solioz และ Bienz (1990)



รูปที่ 3.7 ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ซ

ที่มา : Fujimoto และคณะ (1991)

จากรูปที่ 3.1-3.7 สัญญลักษณ์ต่าง ๆ มีดังนี้

S = สวิชท์ (Switch)

C = ตัวเก็บประจุไฟฟ้า (Capacitor)

P = แหล่งกำเนิดความต่างศักย์ไฟฟ้า (Power supply)

R = ความต้านทานไฟฟ้า (Resistor)

จากรูปที่ 3.6 R_s ซึ่งต่ออนุกรมกับ R_c (ความต้านทานไฟฟ้าของสารละลายเซลล์กับดีเอ็นเอ) ช่วยป้องกันการเกิดประกายไฟฟ้า (Arcing) และ R_p ซึ่งต่อขนานกับ R_c ช่วยควบคุมกระแสไฟฟ้าที่เข้าสู่สารแขวนลอยเซลล์กับดีเอ็นเอ

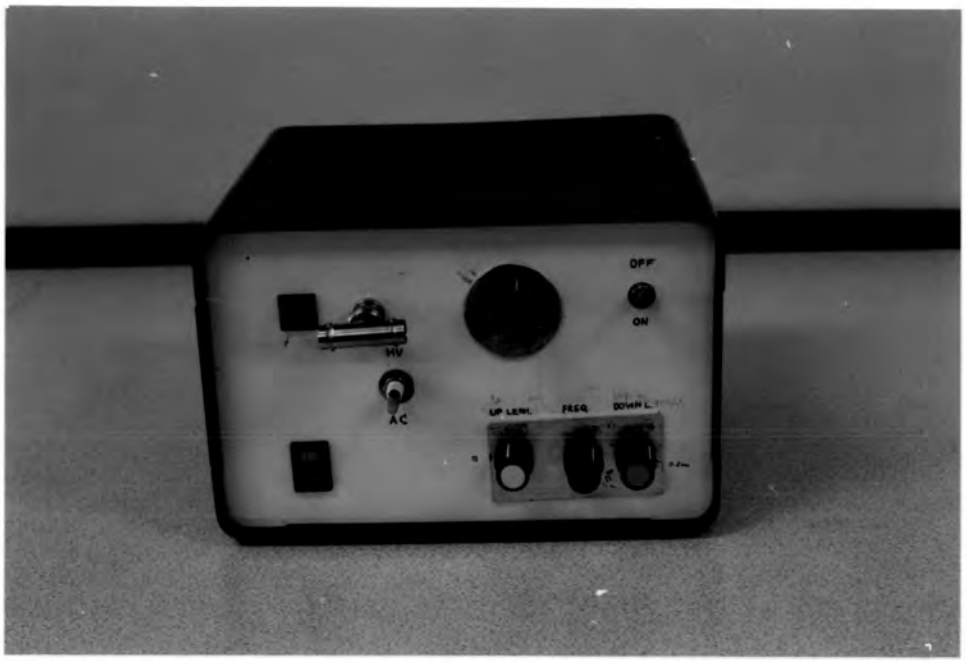
การสร้างเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation apparatus)

จากหลักการทางไฟฟ้าข้างต้นงานวิจัยนี้จึงได้มีการสร้างเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน เพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ 2 แบบด้วยกันดังนี้

1. เครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse) ซึ่งประดิษฐ์และพัฒนามาจากงานวิจัยของ อัญชนา จีนานุพันธ์ (2538) และ
สุกัญญา ป้องทอง (2539) มีคุณสมบัติดังนี้
สามารถให้แรงดันไฟฟ้าในช่วง 0 - 600 V และมีเวลาในการให้สนามไฟฟ้าในช่วง 0 - 15 ms ดังแสดงในรูปที่ 3.8 และ รูปที่ 3.9

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง ได้แก่

- Timer
- วงจรเรคติฟายออร์ และวงจรคลื่นสี่เหลี่ยม (Rectifier and Square wave circuit)
- Regulator ควบคุมแรงดันให้คงที่
- Trigger
- High voltage
- Transformer



รูปที่ 3.8 เครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation apparatus) ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม

รูปที่ 3.9 ระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation system) ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม

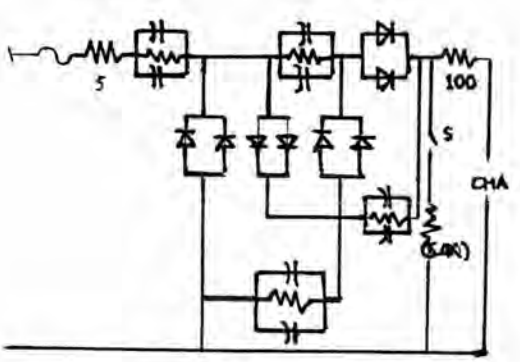
2.เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential decaying pulse) ซึ่งสร้างและดัดแปลงมาจากเครื่องกำเนิดความต่างศักย์ไฟฟ้าความเข้มสูงจากคณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีคุณสมบัติดังนี้

- ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เข้าเครื่องตั้งแต่ 0-150 V
- ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ออกจากเครื่องตั้งแต่ 0-800 V

ส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่

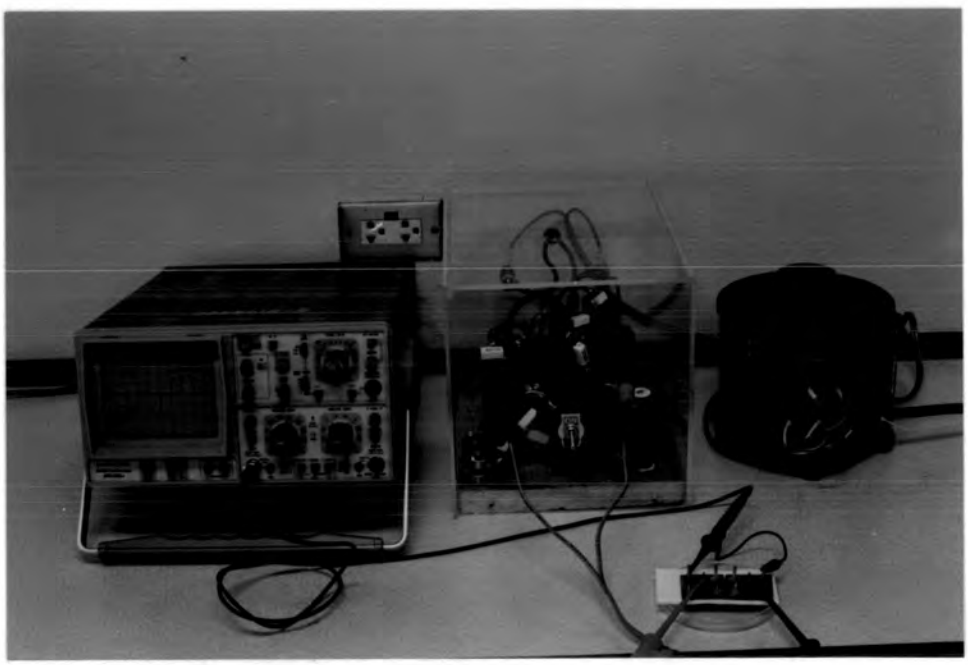
- ไดโอด (Diode)
- ตัวความต้านทานไฟฟ้า (Resistant)
- ตัวเก็บประจุไฟฟ้า (Capacitant)
- หม้อแปลงไฟฟ้า (Transformer)
- สวิซท์ (Swith trigger)

ดังแสดงในรูปที่ 3.10 - 3.12



รูปที่ 3.10 ผังวงจรไฟฟ้าคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล

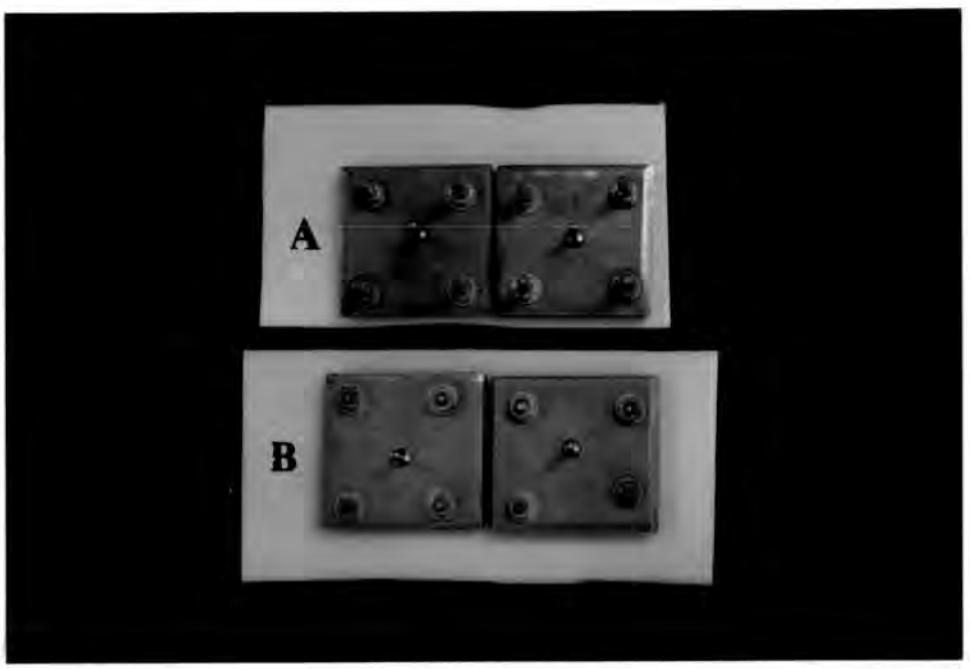
รูปที่ 3.11 เครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล



รูปที่ 3.12 ระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation system) ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล

3. ห้องบรรจุเซลล์ (Chamber)

ห้องบรรจุเซลล์ในระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ประดิษฐ์ขึ้นจากการนำแผ่นสเตนเลสซึ่งใช้เป็นขั้วไฟฟ้าวางบนแผ่นเทฟลอนให้ระยะห่างระหว่างขั้วเท่ากับ 0.1 cm และ 0.2 cm ดังรูปที่ 3.13 ในการบรรจุเซลล์ปริมาตรที่เหมาะสมเท่ากับ 100 μl



รูปที่ 3.13 ห้องบรรจุเซลล์ (Chamber) ที่มีระยะห่างระหว่างขั้วอิเล็กโทรด 0.1cm (A) และ 0.2 cm (B)

การทดสอบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันสร้างขึ้น

การศึกษาความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันโดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม(Square wave pulse) สารละลายที่มีความต้านทานไฟฟ้าสูงจะมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสูง สารละลายที่ให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง จะก่อให้เกิดสนามไฟฟ้าสูง จะทำให้เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันได้ง่าย ในการทดลองนี้จะใช้ออสซิลโลสโคปในการตรวจสอบความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏ โดยแบ่งหัวข้อการศึกษาเป็นข้อย่อยดังนี้

- การศึกษาความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน
- การศึกษาผลความเข้มข้นของกลีเซอรอลกับความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏ
-การศึกษาปริมาตรของสารละลายเซลล์และอัตราส่วนการผสมระหว่างปริมาตรเซลล์กับปริมาตรกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น30% ต่อค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมของสารละลายที่ปรากฏ

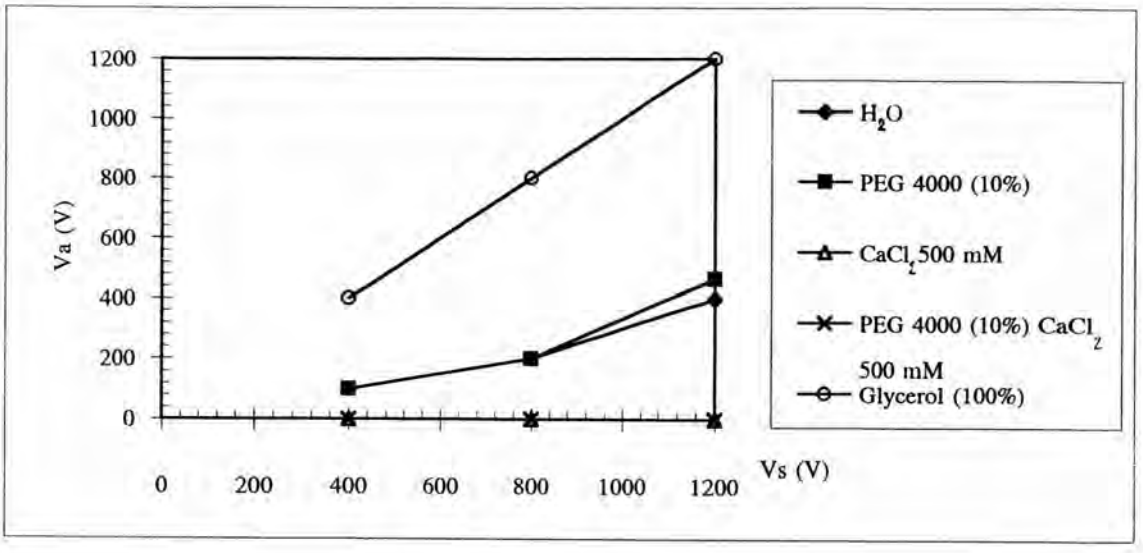
1. การศึกษาความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน

ได้ทำการแปรชนิดของสารละลายที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน แล้ววัดความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่ปรากฏเมื่อ ความต่างศักย์ที่ให้กับระบบเท่ากับ 400, 800 และ 1200 V โดยใส่สารละลายในห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้ว 0.1 cm ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.14

ตารางที่ 3.1 ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่ปรากฏของสารละลายชนิดต่าง ๆ

สารละลาย (50 µl)	ความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่ปรากฏ (actual voltage, V_a)		
	Vs = 400 V	Vs = 800 V	Vs = 1200 V
น้ำ (H_2O)	99	199	400
PEG4000 (10%)	99	199	466
$CaCl_2$ 500 mM	0	0	0
PEG4000(10% $CaCl_2$ 500 mM	0	0	0
Glycerol (100%)	400	800	1200

หมายเหตุ Vs = ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้ระบบ (set voltage)



รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่ปรากฏของสารละลายชนิดต่าง ๆ (ระยะห่างระหว่างขั้วอิเล็กโทรดเท่ากับ 0.1 cm)

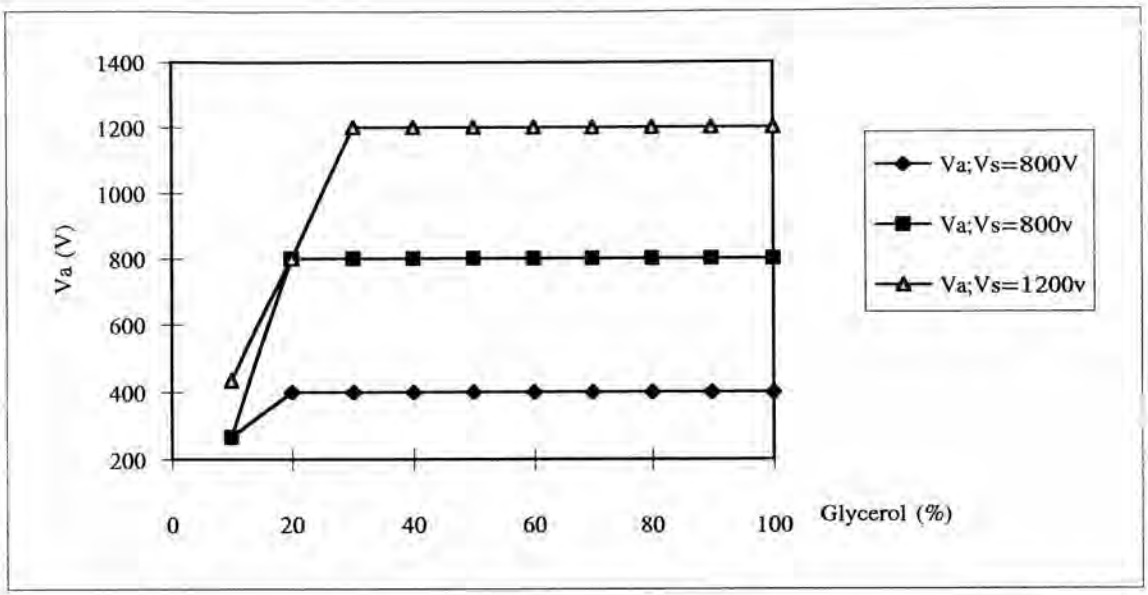
จากตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.14 พบว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 100% มีความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมปรากฏสูงเท่ากับ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบ ดังนั้นจึงนำไปศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในหัวข้อต่อไป

2.การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอล กับความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่ปรากฏ

ในการทดลองนี้จึงได้แปรความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรอลตั้งแต่ 10 - 100% แล้ววัดความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลาย เช่นเดียวกับข้อ 1 โดยใช้ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้ว 0.1 cm ได้ผลดังตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.15

ตารางที่ 3.2 ผลของกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กับความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏที่ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้ว 0.1 cm เมื่อบรรจุปริมาตร 50 μl

ความเข้มข้นสารละลายกลีเซอรอล (%)	ความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏ(V_s)		
	Vs = 400 V	Vs = 800 V	Vs = 1200 V
10	266	266	433
20	400	800	800
30	400	800	1200
40	400	800	1200
50	400	800	1200
60	400	800	1200
70	400	800	1200
80	400	800	1200
90	400	800	1200
100	400	800	1200



รูปที่ 3.15 ความสัมพันธ์ระหว่างกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กับความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏที่ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้ว 0.1 cm

จากตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.15 จะเห็นได้ว่า สารละลายกลีเซอรอลตั้งแต่ความเข้มข้น 30% (v/v) ขึ้นไปจนถึง 100% ให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้ (V_a) เท่ากับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบ(V_s) จึงอาจจะกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลตั้งแต่ 30% (V/V) ขึ้นไปเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลองอิเล็กโทรพอเรชัน

3 การศึกษาปริมาตรของสารละลายเซลล์ที่ปริมาตรต่างๆกันและ อัตราส่วนการผสมระหว่างปริมาตรเซลล์ต่อปริมาตรกลีเซอรอลความเข้มข้น 30% ต่อค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏ

เนื่องจากในการทดลองอิเล็กโทรพอเรชันมีการผสมสารแขวนลอยเซลล์กับสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน ดังนั้นเพื่อที่จะศึกษาความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายเซลล์ที่ผสมกับสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน จึงได้มีการทดลองโดยการเตรียมอัตราส่วนของปริมาตรเซลล์ต่อปริมาตรสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 30% เป็น 2 แบบดังนี้

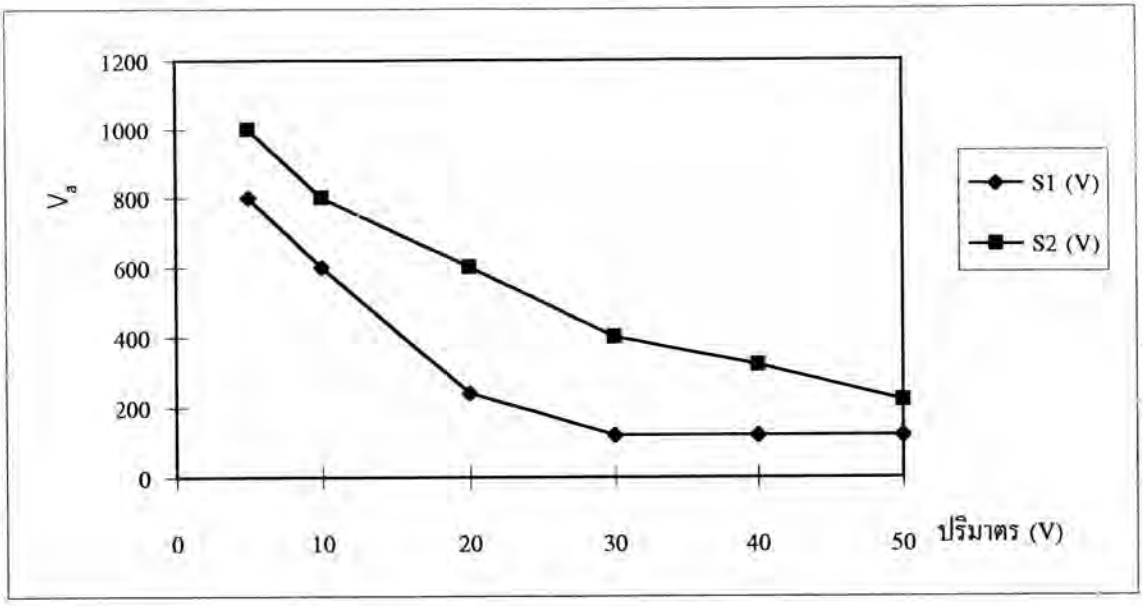
- Stock1 (S1) คือ ผสม 500 µl ของ *E. coli* HB101 ที่แขวนลอยใน 10% กลีเซอรอลกับ 500 µl 30% กลีเซอรอล(หรืออัตราส่วน 1:1)

- Stock2 (S2) คือ ผสม 100 µl ของ *E. coli* HB101 ที่แขวนลอยใน 10% กลีเซอรอลกับ 500 µl 30% กลีเซอรอล(หรืออัตราส่วน 1:5)

แล้วนำไปใส่ในห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้วอิเล็กโทรดเท่ากับ 0.1 cm ที่ปริมาตรต่าง ๆ กัน โดยแปรปริมาตรในช่วง 5 - 50 µl แล้วให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าแก่ระบบเท่ากับ 1200 V แล้ววัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏ ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 3.3 และ รูปที่ 3.16

ตารางที่ 3.3 ผลของปริมาตร S1 และ S2 ต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ปรากฏเมื่อใช้ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะระหว่างขั้วเท่ากับ 0.1 cm และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้ระบบเท่ากับ 1200 V

ปริมาตร (µl)	ความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏ (V_a)	
	ความต่างศักย์ (V) ของ S1	ความต่างศักย์ (V) ของ S2
5	800	1000
10	600	800
20	240	600
30	120	400
40	120	320
50	120	220



รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตร S1 และ S2 ต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏเมื่อใช้ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะระหว่างขั้วเท่ากับ 0.1 cm และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้ระบบเท่ากับ 1200 V

จากตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.16 จะเห็นว่า ปริมาตรของ S1 และ S2 ยิ่งสูงขึ้นจะทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่วัดได้ลดลงตามลำดับ เนื่องมาจากปริมาตรยิ่งสูง จะทำให้ความต้านทานไฟฟ้ามีค่าต่ำ มาถึงจุดหนึ่งจะคงที่และถ้าอัตราปริมาตรส่วนของเซลล์ : ปริมาตรกลีเซอรอล โดยเซลล์ปริมาตรน้อยที่ผสมกับสารละลายกลีเซอรอล (S2) จะทำให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏสูงกว่าเซลล์ปริมาตรมากที่ผสมกับสารละลายกลีเซอรอล (S1) เนื่องมาจากความต้านทานไฟฟ้าของสารแขวนลอยเซลล์มีค่าต่ำมาก เมื่อผสมกับสารละลายกลีเซอรอลจึงทำให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายมีค่าต่ำลงและถ้ายิ่งใช้สารละลายเซลล์ปริมาตรมากขึ้น ก็จะทำให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายยิ่งลดลงไปอีก

จากการทดลองนี้ สามารถนำสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กันไปใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน ในบทที่ 5 และ 6 ต่อไป

สรุป

ในบทนี้ได้กล่าวถึงการประดิษฐ์เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลส่วนเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมนั้นเป็นการนำเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้ามาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน ซึ่งได้มาจากโครงการการหลอมเซลล์ (อัญชนา, 2538 และสุกัญญา, 2539) พร้อมทั้งหาสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่เหมาะสมในการทำอิเล็กโทรพอเรชัน ซึ่งสามารถกล่าวสรุปได้ว่า สารละลายกลีเซอรอลความเข้มตั้งแต่ 10 - 100 % สามารถนำไปใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ต่อไป