

ระบบของไหลจุลภาคสำหรับการอิเล็กโทรพอเรชันเซลล์โอโอไซต์ Microfluidic System for Oocyte Electroporation

นิติพงศ์ ปานกลาง^{1*} นิศรุต พันธศิริ² และ บุญชัย เตชะอำนาจ³

¹ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี nitipong.p@en.rmutt.ac.th*

²ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี nisarut.p@ubu.ac.th

³ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย boonchai.t@chula.ac.th

บทคัดย่อ

บทความนี้นำเสนอการทำอิเล็กโทรพอเรชันกับเซลล์โอโอไซต์ โดยใช้ระบบของไหลจุลภาคที่ออกแบบให้มี Orifice ภายในช่องทางไหล การเกิดช่องเปิดภายหลังการทำอิเล็กโทรพอเรชันได้รับการยืนยันโดยภาพเซลล์ภายใต้แสงยูวีที่สามารถสังเกตการซึมผ่านของสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ การวัดอิมพีแดนซ์ทางไฟฟ้าถูกนำมาใช้ติดตามพฤติกรรม的开ปิดตัวของช่องเปิด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Orifice ภายในช่องทางไหลช่วยให้การทำอิเล็กโทรพอเรชันกับเซลล์โอโอไซต์ประสบความสำเร็จ โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างภายนอกของเซลล์และยังสามารถกำหนดตำแหน่งของการเกิดช่องเปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ณ บริเวณอยู่ใกล้กับ Orifice การกระตุ้นเซลล์ด้วยแรงดันไฟฟ้า 10 V_p ความถี่ 1 kHz ทำให้เกิดช่องเปิดแบบชั่วคราวที่สามารถปิดตัวโดยใช้เวลาเฉลี่ย 79.33±65.33 s ระบบของไหลจุลภาคนี้ สามารถประยุกต์ใช้สำหรับการนำส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์โอโอไซต์ โดยกำหนดพารามิเตอร์ของแรงดันกระตุ้นให้เหมาะสมได้

คำสำคัญ: อิเล็กโทรพอเรชัน ระบบของไหลจุลภาค โอโอไซต์

Abstract

This paper presents the electroporation of oocytes using a microfluidic system designed with orifices within the microchannel. Pore formation after electroporation was confirmed by observing the permeation of a fluorescent dye on cell images under UV illumination. Furthermore, impedance measurement was employed to monitor the behavior of pore closure. Experimental results demonstrated that the orifices in the flow channel enabled successful electroporation of oocytes without causing damage to the external cell structure, and localize pore formation on the cell membrane at the orifice region. The temporary pores closed with an average time of 79.33±65.33 s after 10 V_p, 1 kHz voltage application. The microfluidic system can be applied for delivery of genetic materials into oocytes by optimizing the applied voltage parameters.

Keywords: Electroporation, Microfluidic System, Oocyte

1. บทนำ

อิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation, EP) เป็นเทคนิคในการสร้างช่องเปิด (Pore) บนเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยสนามไฟฟ้า ช่องเปิดจะเกิดขึ้นเมื่อแรงดันตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane Voltage) มีค่าสูงมากพอ [1] ช่องเปิดที่เกิดขึ้นจำแนกได้เป็น 2 แบบ ได้แก่ ช่องเปิดแบบถาวร (Irreversible Pore) และช่องเปิดแบบชั่วคราว (Temporary Pore) ช่องเปิดแบบชั่วคราวสามารถใช้ประโยชน์ในการส่งผ่านโมเลกุลต่างๆ เช่น ยา สารพันธุกรรม หรือโปรตีน ที่ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ตามปกติ เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ [2,3] เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นที่ใช้สร้างช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ (เช่น วิธีทางเคมี, วิธีทางไวรัส) เทคนิคนี้นิยมใช้กับการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ต้องมีการสัมผัสกับเซลล์โดยตรงและเหมาะสมกับการทำอิเล็กโทรพอเรชันแบบเซลล์เดี่ยวในตัวอย่างเซลล์ที่มีจำนวนจำกัด อิเล็กโทรพอเรชันถูกนำไปใช้ในการนำส่งสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์หลากหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็ง [4] เซลล์ภูมิคุ้มกัน [5] เซลล์ประสาท [6] และเซลล์ต้นกำเนิด [7] อิเล็กโทรพอเรชันเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับสำหรับการส่งสารพันธุกรรมและโมเลกุลเข้าสู่เซลล์โอโอไซต์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [8, 9] เซลล์โอโอไซต์ถูกห่อหุ้มด้วยโซนาเพลลูซิดา (Zona Pellucida, ZP) ซึ่งเป็นโครงสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ด้วยเหตุนี้ การทำอิเล็กโทรพอเรชันกับเซลล์โอโอไซต์จึงต้องมีการกำหนดพารามิเตอร์ของสนามไฟฟ้าและออกแบบอุปกรณ์ที่เหมาะสม เพื่อสามารถสร้างช่องเปิดแบบชั่วคราวบนเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้เซลล์โอโอไซต์สามารถพัฒนาต่อไปได้

บทความนี้นำเสนอการทำอิเล็กโทรพอเรชันด้วยระบบของไหลจุลภาคกับเซลล์โอโอไซต์ ระบบของไหลจุลภาคที่ใช้มีความไม่ซับซ้อนและอาศัย Orifice ภายในช่องทางไหลเพื่อควบคุมตำแหน่งของการเกิดช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ การเกิดช่องเปิดหลังการกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้าได้รับการยืนยันโดยการเก็บภาพฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์เพื่อสังเกตการซึมผ่านของสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ นอกจากนั้น วิธีสเปกโทรสโกปีอิมพีแดนซ์ทางไฟฟ้า (Electrical Impedance Spectroscopy, EIS) ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อสังเกตพฤติกรรมการปิดตัวของช่องเปิด ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้ช่องเปิดดังกล่าวช่วยให้การทำอิเล็กโทรพอเรชันกับเซลล์โอโอไซต์ประสบ

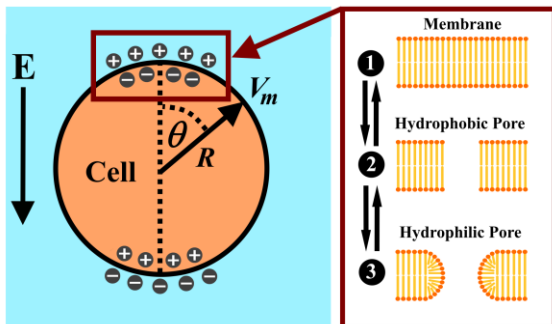
ความสำเร็จโดยสามารถสร้างรูพรุนแบบชั่วคราวบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยไม่ทำความเสียหายต่อโครงสร้างภายนอกของเซลล์และสามารถกำหนดตำแหน่งของการเกิดช่องเปิดได้อย่างแม่นยำ

2. หลักการของอิเล็กโทรพอเรชัน

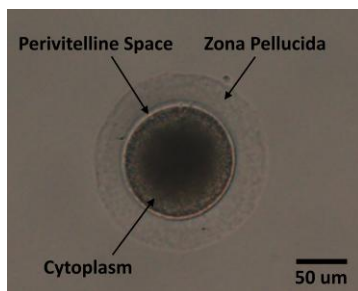
พิจารณาเซลล์ที่มีชีวิตที่อยู่ในสารแขวนลอยและวางตัวอยู่ระหว่างอิเล็กโทรด การจ่ายแรงดันไฟฟ้าให้กับอิเล็กโทรดจะทำให้เกิดสนามไฟฟ้าสร้างประจุสะสมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดแรงดันไฟฟ้าตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ V_m ดังรูปที่ 1 ทั้งนี้ หาก V_m สูงถึงค่าวิกฤตประมาณ 0.5 – 1.5 โวลต์ [10] จะทำให้เกิดช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ V_m ขึ้นอยู่กับรัศมีของเซลล์ R , ขนาดสนามไฟฟ้า E และมุมระหว่างสนามไฟฟ้ากับตำแหน่งวัดแรงดันบนเยื่อหุ้มเซลล์ θ ในสถานะคงตัว (Steady State) [11]

$$V_m = 1.5 ER \cos \theta \quad (1)$$

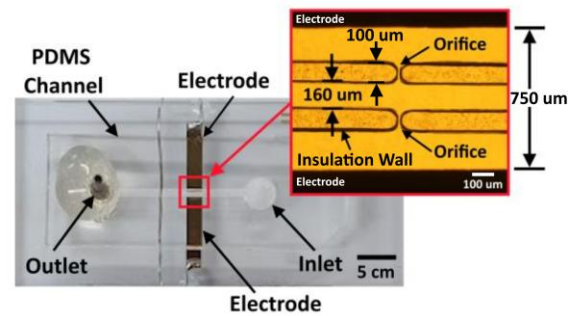
ช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วงแรกจะเป็นช่องเปิดแบบไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Pore) ซึ่งสารพันธุกรรมไม่สามารถซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับแรงดันหรือพลังงานเพิ่มขึ้น ช่องเปิดแบบไม่ชอบน้ำจะมีขนาดเพิ่มขึ้นและเปลี่ยนเป็นช่องเปิดแบบชอบน้ำ (Hydrophilic Pore) ช่องเปิดแบบชอบน้ำยอมให้สารพันธุกรรมภายนอกหรือของเหลวภายในเซลล์ผ่านเข้าออกเซลล์ได้ [10] การใช้ขนาดสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมจะทำให้เกิดช่องเปิดแบบชั่วคราวที่สามารถปิดตัว



รูปที่ 1 แรงดันไฟฟ้าตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดรูพรุนเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า E



รูปที่ 2 ลักษณะของเซลล์โอโอไซต์ในสารแขวนลอย



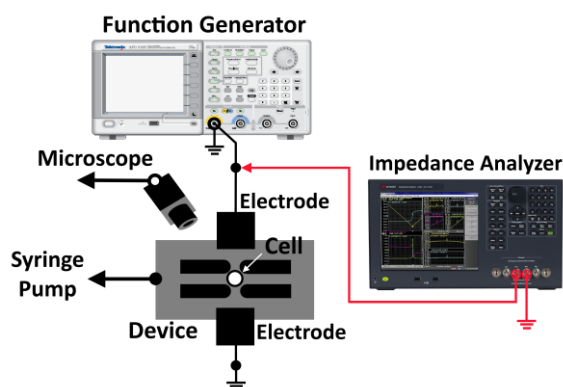
รูปที่ 3 อุปกรณ์ของไหลจุลภาคสำหรับการทำอิเล็กโทรพอเรชัน

ลงอย่างสมบูรณ์ในช่วงเวลาจากวินาทีจนถึงหลายนาที่ [12] ทั้งนี้ หากช่องเปิดที่เกิดขึ้นเป็นแบบถาวรจะนำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์ในที่สุด

3. การทดลอง

การทดลองอิเล็กโทรพอเรชันใช้เซลล์โอโอไซต์ที่ผ่านการปฏิสนธิในหลอดทดลอง (In Vitro Fertilization) การจัดเตรียมเซลล์ดำเนินการโดยภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Veterinary Stem Cell and Bioengineering Innovation Center (VSCBIC) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การเพาะเลี้ยงและการปฏิสนธิในหลอดทดลองของโอโอไซต์ใช้เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนและรายละเอียดตามงานวิจัยในเอกสารอ้างอิง [13] โอโอไซต์ที่มีสภาพสมบูรณ์จะถูกคัดเลือกมาทำการทดลองหลังจากผ่านการปฏิสนธิเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เซลล์รักขายุในสารแขวนลอย HM 287 ที่มีสภาพนำไฟฟ้า 0.8 S/m รูปที่ 2 แสดงลักษณะของเซลล์โอโอไซต์ที่อยู่ในสารแขวนลอย โอโอไซต์มีขนาดประมาณ 160 μm ภายนอกเซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยโซนาเพลลูซิดาซึ่งเป็นส่วนสำคัญในพัฒนาการขั้นต้นของโอโอไซต์และทำหน้าที่ปกป้องเอ็มบริโอ (Embryo)

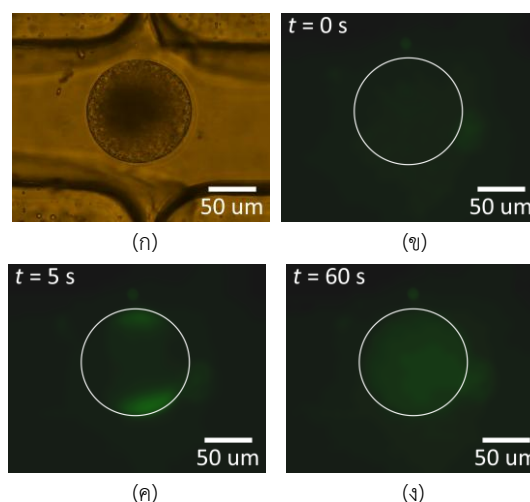
อุปกรณ์ของไหลจุลภาคสำหรับอิเล็กโทรพอเรชันมีส่วนประกอบที่สำคัญได้แก่ อิเล็กโทรดแบบระนาบและช่องทางไหลจุลภาค ดังแสดงในรูปที่ 3 ช่องทางไหลจุลภาคทำจาก Polydimethylsiloxane (KE-106, Shin-Etsu) ด้วยกระบวนการซอฟต์แวร์ลิโทกราฟี (Soft-Lithography) ช่องทางไหลจุลภาคถูกออกแบบให้เหมาะสมกับขนาดเซลล์โอโอไซต์ โดยสามารถป้อนเซลล์เข้าช่องทางไหลและควบคุมการไหลของเซลล์ได้สะดวก ช่องทางไหลหลักมีความกว้าง 1200 μm ภายในของช่องทางไหลประกอบด้วยกำแพงฉนวนที่มีความกว้าง 100 μm ช่องทางไหลระหว่างกำแพงฉนวนมีความกว้าง 160 μm แสดงดังส่วนขยายในรูปที่ 3 บนกำแพงฉนวนมี Orifice ที่มีความกว้าง 25 μm ซึ่งทำหน้าที่บังคับแนวการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรดให้ผ่านเซลล์ ณ ตำแหน่งที่ต้องการ ช่องทางไหลจุลภาคทุกส่วนมีความลึก 175 μm ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์โอโอไซต์ ทางเข้า (Inlet) ช่องทางไหลจุลภาคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 mm สำหรับป้อนตัวอย่างเซลล์เข้าช่องทางไหล ทางออก (Outlet) ต่อกับท่อไหลขนาดเส้น



รูปที่ 4 แผนภาพเค้าร่างการต่ออุปกรณ์สำหรับการทำอิเล็กโทรพอเรชัน

ผ่านศูนย์กลาง 1.2 mm สำหรับเชื่อมต่อกับปั๊มกระบอกฉีดยา อิเล็กโทรดที่ใช้เป็นแบบระบายทำจากทองด้วยกระบวนการโฟโตลิโทกราฟี (Photolithography) ทองถูกเคลือบด้วยการสปัตเตอริง (Sputtering) บนฐานกระจกขนาด 25×76 mm² โดยมีโครเมียมเป็นชั้นยึดติดกับฐานกระจก ชั้นโลหะทั้งสองมีความหนาประมาณ 200 nm อิเล็กโทรดมีระยะห่างเท่ากับ 750 μm

แผนภาพเค้าร่างของการต่ออุปกรณ์ต่างๆ เพื่อทำอิเล็กโทรพอเรชันในเซลล์โอโอไฮต์แสดงดังรูปที่ 4 อุปกรณ์ของไหลจุลภาคเชื่อมต่อกับเครื่องกำเนิดสัญญาณ (AFG3022C, Tektronix), เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ (E4990A, Keysight) และมีกระบอกฉีดยา (Fusion 200, Chemyx Inc.) เครื่องกำเนิดสัญญาณเป็นแหล่งจ่ายแรงดันพัลส์สี่เหลี่ยมสำหรับการทำอิเล็กโทรพอเรชัน การทำอิเล็กโทรพอเรชันใช้แรงดัน 10 V_p ความถี่ 1 kHz จ่ายให้กับอิเล็กโทรดจำนวนทั้งหมด 5 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งจะจ่ายพัลส์เป็นระยะเวลา 300 ms เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ใช้วัดความนำไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรด โดยค่าที่วัดได้ถูกส่งไปบันทึกข้อมูลบนเครื่องคอมพิวเตอร์ การวัดความนำไฟฟ้าใช้แรงดัน 100 mV ความถี่ 200 kHz ด้วยอัตราการสุ่มตัวอย่าง (Sampling Rate) 8 kS/s เครื่องกำเนิดสัญญาณ, เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ และกล้องจุลทรรศน์ (IX73, Olympus) สำหรับเก็บภาพเซลล์เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์และถูกควบคุมด้วยโปรแกรม MATLAB (R2022b, MathWorks) ก่อนการทดลอง ช่องทางไหลจุลภาคถูกเคลือบด้วยสารละลาย Bovine Serum Albumin 2% v/v ในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 60 นาที เซลล์โอโอไฮต์ในสารละลาย HM 287 ที่มีสารฟลูออเรสเซนต์ Yo-Pro-1 (Invitrogen) ความเข้มข้น 2 μM ถูกป้อนเข้าช่องทางไหลด้วยปั๊มกระบอกฉีดยา Yo-Pro-1 เป็นสีย้อม Monomeric Cyanine Nucleic Acid ทำให้นิวเคลียสของเซลล์เกิดการเรืองแสงสีเขียวความยาวคลื่น 509 nm ภายใต้การกระตุ้นด้วยแสงยูวีความยาวคลื่น 488 nm ปั๊มถูกปิดเมื่อตัวอย่างเซลล์เข้าสู่ช่องทางไหลและเซลล์ถูกจัดวางตำแหน่งตรง Orifice ภายในช่องทางไหล โดยการควบคุมด้วยมือผ่านตัวอย่างซิลิโคนที่ต่อกับทางออกของช่องทางไหล ขณะทำการทดลอง ภาพฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ถูกบันทึกภาพทุกๆ 30 s ใน



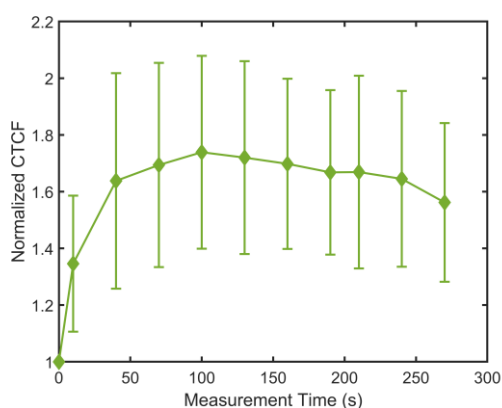
รูปที่ 5 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้า 10 V_p ความถี่ 1 kHz เป็นเวลา 300 ms (ก) สภาพเซลล์ก่อนการป้อนแรงดัน (ข) ถึง (ง) ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนต์ที่ $t = 0$ s ถึง $t = 60$ s ตามลำดับ.

ขณะเดียวกัน ความนำไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรดถูกวัดทุกๆ 2 s เพื่อนำมาวิเคราะห์ผลต่อไป

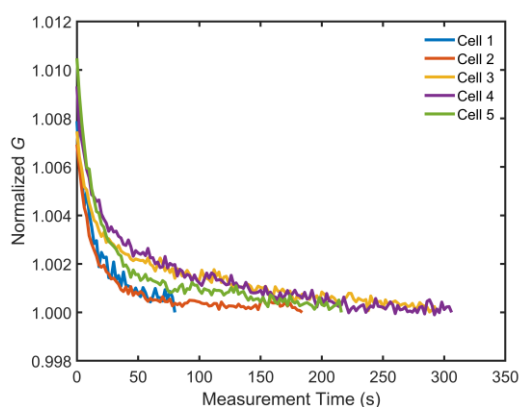
4. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล

รูปที่ 5 (ก) แสดงตำแหน่งของเซลล์ขณะทำการกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้าให้เกิดอิเล็กโทรพอเรชัน เซลล์ถูกจัดตำแหน่งให้อยู่ระหว่าง Orifice ด้านบนและด้านล่าง ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ถูกใช้ประเมินการเกิดช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ ช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ในสารละลายภายนอกเซลล์ซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ รูปที่ 5 (ข) แสดงภาพถ่ายฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ก่อนการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า ($t = 0$ s) ซึ่งจะสังเกตเห็นฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์ รูปที่ 5 (ค) แสดงการซึมผ่านของสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (สีเขียว) หลังจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าเป็นเวลา 5 s การสังเกตเห็นสีย้อมเริ่มขึ้นตรงตำแหน่งที่เซลล์อยู่ใกล้กับ Orifice ทั้งด้านบนและด้านล่าง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงตำแหน่งของช่องเปิดที่เกิดขึ้น ณ บริเวณดังกล่าว เมื่อเวลาผ่านไป สีย้อมฟลูออเรสเซนต์แพร่กระจายเข้าสู่ภายในเซลล์จนทั่วบริเวณ ดังแสดงในรูปที่ 5 (ง) นอกจากนั้น การทดลองแสดงว่าเซลล์โอโอไฮต์มีสภาพสมบูรณ์ โดยสังเกตจากโครงสร้างของโซนาเพลลูลิดาและเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่เสียหายหลังจากการกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้า

การวิเคราะห์ค่า Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อแสดงปริมาณสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่เข้าสู่เซลล์โอโอไฮต์ CTCF คำนวณโดยใช้ความเข้มของสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์ในขอบเขตวงกลมสีขาวที่แสดงดังรูปที่ 5 (ข) - (ง), ความเข้มของสีย้อมฟลูออเรสเซนต์พื้นหลังที่ไม่มีเซลล์และพื้นที่ภายในเซลล์ ความเข้มของสีย้อมฟลูออเรสเซนต์เปลี่ยนแปลงตามเวลาขึ้นอยู่กับขนาดของช่องเปิดและช่วงเวลาที่ช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลง CTCF หลังจากกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้า 10 V_p ความถี่ 1 kHz เป็นเวลา 300 ms



รูปที่ 7 ตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงของค่า G หลังจากกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้า

Normalized CTCF หลังจากกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้า CTCF ถูกทำให้เป็นบรรทัดฐานด้วย CTCF₀ ที่ได้จากการวัดก่อนการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า Normalized CTCF ในรูปที่ 6 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังกระตุ้นด้วยไฟฟ้า จนถึงค่าสูงสุดซึ่งแสดงถึงการคงสภาพเปิดของช่องเปิดที่ทำให้สีย้อมซึมเข้าสู่เซลล์อย่างต่อเนื่อง จากนั้น Normalized CTCF ค่อยๆ ลดลงซึ่งคาดว่า เป็นผลจากการเริ่มปิดของช่องเปิดทำให้สีย้อมซึมเข้าสู่เซลล์ลดลง Normalized CTCF มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.74 ที่เวลา 100 s

ความนำไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรดถูกวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์เพื่อประเมินการปิดตัวของช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์หลังจากการป้อนแรงดันกระตุ้นอิเล็กโทรพอเรชัน รูปที่ 7 แสดงตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงของค่าความนำไฟฟ้าสำหรับเซลล์จำนวน 5 เซลล์ ค่าความนำไฟฟ้า G ถูกทำให้เป็นบรรทัดฐานด้วย G_{min} ซึ่งเป็นความนำไฟฟ้าต่ำสุดที่วัดได้ของเซลล์นั้นๆ หลังจากการกระตุ้นด้วยแรงดันไฟฟ้า พบว่า G ในช่วงแรกมีค่าสูงขึ้น เป็นผลจากการเกิดช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านเซลล์ได้ดีขึ้น การเพิ่มขึ้นของค่า G นี้สอดคล้องกับค่า CTCF ที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงแรก เมื่อเวลาผ่านไปค่า G ค่อยๆ ลดลงซึ่ง

เป็นผลมาจากการปิดตัวของช่องเปิด จุดต่ำสุดของ G แสดงเป็นนัยถึงการปิดตัวโดยสมบูรณ์ของช่องเปิด การลดลงของค่า G จนถึงจุดต่ำสุดในแต่ละเซลล์แตกต่างกันเป็นผลจากเวลาปิดตัวของช่องเปิดที่ไม่เท่ากัน แม้ว่าช่องเปิดที่เกิดขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เดียวกันก็ตาม [14] จากผลการทดลองกับเซลล์โอโอไฮต์ทั้งหมด 12 เซลล์ คณะผู้วิจัย พบว่า เวลาเฉลี่ยของการปิดตัวของช่องเปิดมีค่าเท่ากับ 79.33 ± 65.33 s ภายใต้เงื่อนไขการป้อนพัลส์ไฟฟ้าที่ใช้ในการศึกษานี้

5. สรุป

การอิเล็กโทรพอเรชันเซลล์โอโอไฮต์ด้วยระบบของไหลจุลภาคที่มี Orifice ภายในช่องทางไหลสามารถสร้างช่องเปิดแบบชั่วคราวบนเยื่อหุ้มเซลล์โอโอไฮต์ โดยไม่สร้างความเสียหายต่อโครงสร้างภายนอกของเซลล์ การเปิดและปิดของช่องเปิดแบบชั่วคราวที่เกิดขึ้นถูกยืนยันด้วยการซึมผ่านของสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่เข้าสู่เซลล์และการวัดค่าความนำไฟฟ้าที่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลา การปิดตัวของช่องเปิดมีเวลาเฉลี่ยเท่ากับ 79.33 ± 65.33 s เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยแรงดันรูปลิ้นสี่เหลี่ยม 10 V_p ความถี่ 1 kHz การสร้างช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์สามารถกำหนดตำแหน่งของการเกิดช่องเปิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่ใกล้กับ Orifice ภายในช่องทางไหล ระบบของไหลจุลภาคที่นำเสนอสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการนำส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์โอโอไฮต์ โดยสามารถปรับพารามิเตอร์ของแรงดันกระตุ้นในการทำอิเล็กโทรพอเรชันให้เหมาะสมได้

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สัญญาเลขที่ N42A660501, ผู้เขียนขอขอบคุณ สพ.ญ.ดร.วิราภรณ์ กัลยาณะธรรม และ รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราชาณิต ภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการเตรียมตัวอย่างเซลล์โอโอไฮต์, นางสาวชนันธร ชนนนวรร และ ดร.มติ ห่อประทุม ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC) ในการจัดทำอิเล็กโทรด, ศาสตราจารย์ ดร.อรรถพรณ ชัยลาภกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิมย์ม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ SHOWA DENKO สำหรับวัสดุและความช่วยเหลือในการทำอุปกรณ์ของไหลจุลภาค

เอกสารอ้างอิง

- [1] B. Bu et al., "High transmembrane voltage raised by close contact initiates fusion pore," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 9, 2016, Art. no. 136.
- [2] E. Neumann et al., "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields," *The EMBO Journal*, vol. 1, no. 7, pp. 841–845, 1982.

- [3] J. M. Escoffre and M. P. Rols, *Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [4] A. Golberg et al., "Microfluidic electrochemotherapy of cancer cells," *Biomedical Microdevices*, vol. 12, no. 5, pp. 779-787, 2010.
- [5] M. De Robertis and E. Signori, "Immunogenic Effects and Clinical Applications of Electroporation-Based Treatments," *Vaccines*, vol. 12, no. 1, Art. no. 42, Dec. 2023.
- [6] T. F. Yuan, M. Menéndez-González, and O. Arias-Carrión, "Single neuron electroporation in manipulating and measuring the central nervous system," *Int. Arch. Med.*, vol. 3, Art. no. 28, Nov. 2010.
- [7] M. Sharifi Tabar et al., "Evaluating Electroporation and Lipofectamine Approaches for Transient and Stable Transgene Expressions in Human Fibroblasts and Embryonic Stem Cells," *Cell J.*, vol. 17, no. 3, pp. 438-450, 2015.
- [8] J. L. Young and D. A. Dean, "Electroporation-mediated gene delivery," *Adv. Genet.*, vol. 89, pp. 49-88, 2015.
- [9] B. A. Hakim et al., "Electroporation of Mouse Follicles, Oocytes and Embryos without Manipulating Zona Pellucida," *J. Dev. Biol.*, vol. 9, no. 2, Art. no. 13, Apr. 2021.
- [10] J. C. Weaver, "Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues," *J. Cell. Biochem.*, vol. 51, no. 4, pp. 426-435, 1993.
- [11] T. Y. Tsong, "Electroporation of cell membranes," *Biophys. J.*, vol. 60, no. 2, pp. 297-306, 1991.
- [12] W. Krassowska and P. D. Filev, "Modeling electroporation in a single cell," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 2, pp. 404-417, Jan. 2007.
- [13] W. Kallayanathum et al., "Novel electroporation microchip with field constriction enhances transfection efficiency and survival rates of feline embryos," *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, Art. no. 29508, 2024.
- [14] H. Flores-Romero, U. Ros, and A. J. Garcia-Saez, "Pore formation in regulated cell death," *The EMBO Journal*, vol. 39, no. 23, Art. no. e105753, 2020.