บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

นิยามของพลาสมา

พลาสมา (plasma) เป็นคำที่มาจากภาษากรีก (Greek) ซึ่งหมายถึงเบ้าหลอมหรือแม่พิมพ์ (mold) หรือทอเป็นเนื้อขึ้นมา (fabricate) ในเชิงฟิสิกส์พลาสมาคือสภาวะหนึ่งของสสาร นอกเหนือจากสถานะของ ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ สถานะต่าง ๆ เหล่านี้ถูกนิยามด้วยขนาดของแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (binding force) หรืออะตอมของสสาร ค่าแรงยึดเหนี่ยวในของแข็งจะมีมากแต่เมื่อได้รับการกระตุ้นจากพลังงานภายนอกของแข็งก็สามารถเปลี่ยนสถานะของแข็งเป็นของเหลวหรือก๊าซ และในขณะเดียวกันถ้าของเหลวถูกกระตุ้นจากพลังงานภายนอกก็สามารถเปลี่ยนสถานะของของเหลวเป็นก๊าซได้ และเมื่อก๊าซถูกกระตุ้นจากพลังงานภายนอกจนทำให้เกิดการแตกตัว (ionization) ก๊าซก็อาจเปลี่ยนสถานะเป็นพลาสมาได้

คุณลักษณะของพลาสมา คือการมีสถานะของก๊าซที่มีอนุภาคที่มีประจุเชิงสะเทินหรือก๊าซซึ่งประหนึ่งเป็นกลางทางไฟฟ้า (Quasineutral gas of charge) ประกอบด้วยอนุภาคที่มีประจุและอนุภาคที่เป็นกลาง โดยแสดงพฤติกรรมร่วมกัน (collective behavior) (Chen, 1984) และซึ่งก็คือ การเคลื่อนที่ของอนุภาคในพลาสมา ไม่เพียงแต่จะขึ้นกับเงื่อนไขในบริเวณอนุภาคนั้นๆ แต่ยังขึ้นกับสถานะของพลาสมาที่อยู่บริเวณห่างไกลออกไปอีกด้วย กล่าวคือเมื่ออนุภาคประจุภายในพลาสมามีการเคลื่อนที่ อนุภาคเหล่านี้สามารถทำให้เกิดความหนาแน่นของประจุบวกและลบในบริเวณหนึ่งๆ ซึ่งทำให้เกิดสนามไฟฟ้าขึ้น นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของอนุภาคประจุยังทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดสนามแม่เหล็กอีกด้วย ทั้งสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็กนี้เองที่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของประจุตัวอื่นๆ ที่อยู่ไกลออกไป เราจึงมองได้ว่าพลาสมามีลักษณะคล้ายก้อนเจลลี่นุ่มที่สามารถเคลื่อนไหวเปลี่ยนรูปร่างได้ แต่ยังรวมตัวกันอยู่เป็นกลุ่มก้อน (พันธวัฒน์, 2546)

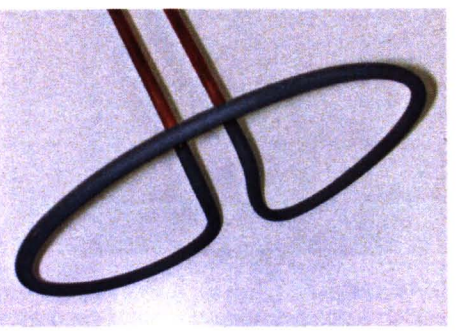
ระบบผลิตพลาสมาโดยการดิสชาร์จแบบเหนี่ยวนำด้วยคลื่นวิทยุ (นิรุต, 2545)

แหล่งพลาสมาซึ่งผลิตพลาสมาแบบเหนี่ยวนำ (inductively coupled plasma, ICP) อย่างง่ายสามารถให้พลาสมาความหนาแน่นสูงได้มากถึง 10^{10}-10^{12} cm^{-3} (Anders, 2000) พลาสมาที่ผลิตได้มีความเสถียรและสะอาด แหล่งผลิตชนิดนี้ประกอบด้วย แชมเบอร์สุญญากาศ แหล่งกำเนิดคลื่นวิทยุที่ให้กำลังแก่ขดลวดเหนี่ยวนำ (RF induction coil) จะเหนี่ยวนำให้เกิดสนามไฟฟ้าซึ่งจะทำให้เกิดการแตกตัวของก๊าซบางส่วนภายในแชมเบอร์ จะรักษาสภาพพลาสมานั้นไว้

องค์ประกอบของระบบผลิตพลาสมาแบบเหนี่ยวนำ

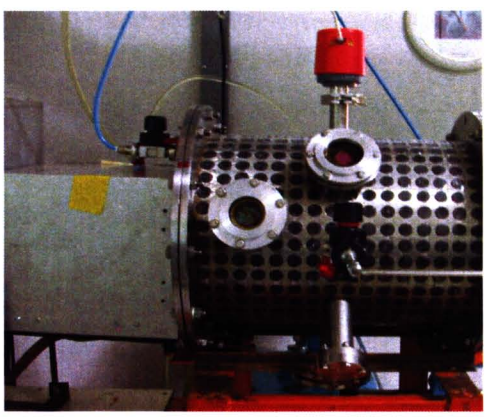
1. แหล่งกำเนิดคลื่นวิทยุความถี่ (RF generator) 13.56 เมกะเฮิร์ท Dresslor รุ่น HPG 1365 สามารถให้กำลังสูงสุด 6.5 กิโลวัตต์ มีระบบระบายความร้อนด้วยน้ำ มีตัวปรับสัญญาณคลื่นวิทยุให้มีความสมดุลโดย matching box โดยสามารถให้กำลังคลื่นวิทยุได้ทั้งแบบต่อเนื่องและแบบห้วง ในการทดลองนี้ทำการทดลองเฉพาะแบบต่อเนื่อง

2. สายอากาศ (Antenna) สำหรับห้องปฏิบัติการนี้ได้ใช้สายอากาศเป็นแบบประเภทขดลวดเหนี่ยวนำอยู่ในแชมเบอร์



ภาพ 1 สายอากาศ (Antenna)

3. แชมเบอร์พลาสมาแบบกลีบมะเฟืองรูปทรงกระบอก ทำจากสแตนเลสเส้นผ่านศูนย์กลาง 31.2 ซ.ม. ยาว 42.5 ซ.ม. ผนังหนา 6.0 ม.ม. ที่ผิวด้านนอถูกเจาะโดยรอบลึก 4.0 ม.ม. เพื่อฝังแม่เหล็กถาวรแบบกระดุมขนาด 18.0 ม.ม. หนา 5.0 ม.ม. รอบๆ จำนวน 611 เม็ด และที่ฝาปิดทั้งสองด้านอีก 88 เม็ด โดยการจัดวางแบบ broken-line cusp ความเข้มสูงสุดของสนามแม่เหล็กมีค่า 2.2 กิโลเกาส์ และที่ผิวด้านในวัดความเข้มของสนามแม่เหล็กได้ 670 เกาส์ (Suanpoot *et al.*, 1998)



ภาพ 2 แชมเบอร์แบบกลีบมะเฟือง

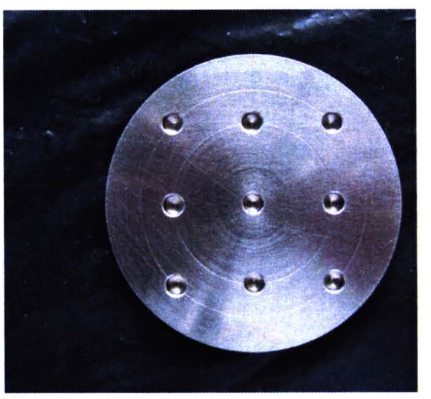
4. ระบบสร้างความต่างศักย์แรงดันสูงแบบห้วง (pulse high-volt generator) ระบบสร้างความต่างศักย์แรงดันสูงแบบห้วง สามารถสร้างแรงดันลบได้ตั้งแต่ 2.5 – 30 กิโลโวลต์ ความถี่ 1 – 2,000 เฮิร์ท ความกว้างของช่วงความถี่ (pulse widths) 5 -100 ไมโครวินาที

ภาพ 3 ระบบสร้างความต่างศักย์แรงดันสูงแบบห้วง

5. การสร้างระบบให้แรงดันสูง (High Voltages) ระบบให้แรงดันสูงเดิมมีช่วงการทำงานที่ 2.5 -30 กิโลโวลต์ ซึ่งสูงเกินกว่าความต้องการในการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ ดังนั้นจึงได้ทำการออกแบบสร้างระบบให้แรงดันใหม่ให้มีช่วงการทำงานอยู่ที่ 1 – 1000 โวลต์ เพื่อรองรับกับการใช้งานที่ต้องการแรงดันต่ำกว่าเดิมในงานทางด้านชีววิทยา

ภาพ 4 ระบบจ่ายไฟฟ้าและระบบจ่ายแรงดันที่สร้างเสร็จ

6. Holder เป็นวัสดุที่ใช้สำหรับใส่ตัวอย่างโดยมีลักษณะเป็นหลุม 9 หลุม



ภาพ 5 ลักษณะของ Holder

กระบวนการเกิดระบบพลาสมา (Process of Plasma system) (เกษม, 2549)

1. การแตกตัว (Ionization)

คือการทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากอะตอม เนื่องจากอะตอมหรือโมเลกุลของก๊าซได้รับพลังงาน หรือความร้อนจากภายนอกมากเพียงพอที่จะเปลี่ยนสถานะเป็นพลาสมา หรือการให้ศักย์ของคลื่นความถี่วิทยุ (RF generator) ที่มีการลดความดันของก๊าซลงมาอยู่ที่ 1 mbar ซึ่งกระบวนการที่แตกตัวเป็นไอออน อิเล็กตรอนที่เกาะอยู่กับอะตอมจะหลุดออกมา ทำให้อะตอมกลายเป็นไอออนและเกิดการรุ่งแสง (Glow discharge) เปลี่ยนสถานะเป็นพลาสมา จะได้ชนิดของก๊าซที่มีการเปล่งแสง แสงเหนือม่วง (Ultraviolet) ที่เกิดขึ้น และความถี่แสงในช่วงที่มองเห็นด้วยตาเปล่าจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 นาโนเมตร ลักษณะการรุ่งแสงตัวอย่าง เช่น ก๊าซอาร์กอนให้แสงชมพูอมม่วง ไนโตรเจนให้แสงสีน้ำเงิน การแตกตัวและค่าพลังงานมีค่าดังนี้

Ionization energy of Argon

$e^- + Ar \longrightarrow Ar^+ + e^-$ First ionization energy 15.7 eV

$e^- + Ar \longrightarrow Ar^{2+} + e^-$ Second ionization energy 27.6 eV

$e^- + Ar^{2+} \longrightarrow Ar^{3+} + e^-$ Third ionization energy 40.7 eV

Ionization energy of Nitrogen

$e^- + N_2 \longrightarrow e^- + 2N$ First ionization energy 10 eV

1.1 การถูกกระตุ้น (Excitation)

การส่งผ่านอย่างกะทันหันของพลังงาน ย่อมทำให้อิเล็กตรอนกระโดดไปยังชั้นที่มีพลังงานสูงกว่าในอะตอม กระบวนการนี้คือกระบวนการกระตุ้นสถานะของอะตอม ตัวอย่างเช่น

(* คือสถานะกระตุ้น)

$$e^- + Ar \longrightarrow Ar^* + e^-$$

$$e^- + N_2 \longrightarrow e^- + N_2$$

1.2 การแยกตัวออก (Dissociation)

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยก๊าซถูกกระทำโดยศักย์ของคลื่นความถี่วิทยุ กระบวนนี้ได้แก่ กระบวนการแยกตัวของก๊าซออกซิเจน (O_2) สามารถแตกตัวได้เป็นออกซิเจน 2 อะตอม อย่างไรก็ตาม monoatom gas เช่น ก๊าซอาร์กอน (Ar) ทุกชนิดไม่สามารถที่จะแยกตัวได้

กระบวนการแยกตัวออก ตัวอย่างเช่น

$$e^- + O_2 \longrightarrow e^- + O + O$$

$$e^- + N_2 \longrightarrow 2N + e^-$$

ผลลัพธ์ของการแยกตัวออก คือการเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี ผลที่ได้จะมีปฏิกิริยาไวกว่าปฏิกิริยาของโมเลกุลเดิม การแยกอาจจะเกิดควบคู่กับการแตกตัวหรือไม่ก็ได้ ตัวอย่างเช่น

$$e^- + CF_4 \longrightarrow e^- + CF_3 + F \quad \text{(DISSOCIATION)}$$

$$e^- + CF_4 \longrightarrow 2e^- + CF_3 + F \quad \text{(DISSOCIATION IONIZATION)}$$

ผลการเรืองแสงของก๊าซที่ลดความดัน และศักย์ของคลื่นวิทยุที่กระตุ้น จะสังเกตเห็นพลาสมาที่เปล่งแสงที่เรียกว่า glow discharge ซึ่งแสงของพลาสมาที่เปล่งออกมาเนื่องมาจากพลังงานภายนอกที่ทำให้เวเลนซ์อิเล็กตรอนถูกกระตุ้นจากสถานะพื้นเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในสถานะถูกกระตุ้น

โดยปรกติอิเล็กตรอนสามารถอยู่ในสถานะกระตุ้นได้เพียงช่วงสั้นมาก ๆ คือ โดยประมาณ 10^{-18} s จากนั้นเวเลนซ์อิเล็กตรอนจะกลับคืนสู่สถานะพื้น และปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่ของแสงในช่วงที่มองเห็น

แสงพลาสมาที่เปล่งออกมา จะแสดงถึงลักษณะก๊าซที่แตกตัว เช่น ก๊าซอาร์กอนจะเปล่งแสงเป็นสีชมพูอมม่วง และก๊าซไนโตรเจนจะเปล่งแสงเป็นสีน้ำเงิน

ผลการเรืองแสงของก๊าซที่ลดความดัน และศักย์ของคลื่นวิทยุที่กระตุ้น พลาสมาซึ่งจะประกอบไปด้วย active species ตัวอย่างเช่น กรณีของก๊าซออกซิเจน อะตอมของก๊าซออกซิเจนจะเกิดออกซิไดซ์ กับโมเลกุลสารอินทรีย์ เช่น วัสดุเซลลูโลส พอลิเมอร์ ผ้า และอื่น ๆ และสามารถทำความสะอาดชิ้นงานได้

1.3 การแลกเปลี่ยนประจุ (Charge exchange)

คือการถ่ายเทประจุกับอะตอม จะเกิดขึ้นได้ง่ายมาก หากเป็นการแลกเปลี่ยนไอออนกับอะตอมของธาตุเดียวกัน ตัวอย่างเช่น

$$e^- + CF_4 \longrightarrow e^- + CF_3 + F$$

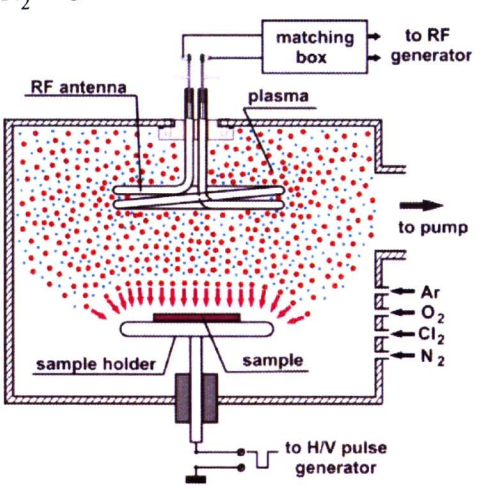
$$Ar^+ + Ar \longrightarrow Ar + Ar^+$$

1.4 การถ่ายเทโมเมนตัม (Momentum transfer)

เป็นกลไกเบื้องต้นสำหรับการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมของแรงจากการชนของอะตอม กรณีก๊าซที่เป็นกลาง การถ่ายเทโมเมนตัมของอิเล็กตรอนไม่ได้มีความสำคัญของการรุ่งแสงมากนักของก๊าซที่เป็นกลาง แต่เป็นกระบวนการที่สามารถเกิดพลาสมาได้ เช่นกรณีก๊าซไนโตรเจน ตามสมการ

$$N_2^+ + N_2 \longrightarrow N_2^+ + N_2$$

$$e^- + N_2 \longrightarrow N_2 + e^-$$



ภาพ 6 กระบวนการเกิดระบบพลาสมา

หลักการหรือกระบวนการเกิดระบบพลาสมา ได้นำไปใช้ประโยชน์ในงานทางด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ และอุตสาหกรรมทางการแพทย์ โดยงานทางด้านต่าง ๆ ทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ช่วยเพิ่มมูลค่าในอุตสาหกรรมนั้น ๆ ซึ่งคุณสมบัติที่เกิดขึ้นอย่างเช่น การป้องกันการกันเปื้อน เพื่อการยึดเกาะที่ดีขึ้น และช่วยป้องกันความชื้นของผลิตภัณฑ์ได้ จากคุณสมบัตินั้นล้วนแล้วเกิดจากการนำพลาสมามาประยุกต์ใช้

พลาสมาเป็นเทคนิคหนึ่งทางศาสตร์ของฟิสิกส์ที่นำมาประยุกต์ใช้ เพื่อเพิ่มคุณสมบัติต่าง ๆ เพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ เมื่อมีการเปรียบเทียบเทคนิคพลาสมากับเทคนิคฟิสิกส์อื่น ๆ เช่น เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำ ซึ่งช่วงระยะแรกเทคนิคลำไอออนได้นำมาใช้ในงาน Electronic device fabrication และ Material modification ต่อมาได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในงานด้านต่างๆ มากขึ้นนอกเหนือจากงานทางด้านฟิสิกส์ เช่น การแพทย์ การรักษาโรคมะเร็งด้วยโปรตอนและไอออนมวลหนัก งานทางด้านโบราณคดีโดยการไอโซโทปกัมมันตรังสีปริมาณน้อยที่ปนอยู่ท่ามกลางไอโซโทปเสถียรจำนวนมากเพื่อหาอายุของวัตถุโบราณ ส่วนงานด้านเคมีวิเคราะห์ธรณีวิทยา เช่น การเปลี่ยนสีของอัญมณี สำหรับงานทางด้านวัสดุศาสตร์ จะเกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพื้นผิวโลหะ ภายหลังต่อมาได้มีการประยุกต์นำเอาเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำนำมาใช้กับงานทางด้านชีววิทยา และการเกษตร ได้แก่ ไอออนบีมกับงานทางด้านการส่งถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และ ไอออนบีมกับงานทางด้านการเกษตร (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

ไอออนบีมกับงานทางด้านชีววิทยา

ได้มีรายงานการส่งถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยใช้เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำชักนำการส่งถ่าย *Gus* gene (beta - glucoronidase) และ *cat* gene (Chloramphenical acetyltransferase) เข้าสู่เซลล์แขวนลอย และเอ็มบริโอของข้าว โดยใช้ลำไอออนของอาร์กอน พบว่าเซลล์แขวนลอยและเอ็มบริโอของข้าว มีการแสดงออกของ *Gus* gene ซึ่งในการส่งถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เข้าสู่เซลล์พืชนี้ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัด แต่มีข้อสันนิษฐานว่า อาจเกิดจาก 2 กลไก คือ (1) เมื่อเซลล์ถูกระดมยิงด้วยลำไอออนจะมีผลทำให้เกิดรูบนผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้พลาสมิดถูกส่งเข้าสู่เซลล์ได้ (2) เมื่อเซลล์ถูกระดมยิงด้วยลำไอออน จะทำให้ภายในเซลล์มีประจุเป็นบวกเพิ่มมากขึ้น ทำให้ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ (Yu *et. al*.. 1993)

ต่อมา Vilaithong *et al.* (2000) ได้ทดลองส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย และเนื้อเยื่อพืชพบว่าการใช้ลำไอออนของไนโตรเจนโมเลกุล สามารถทะลุทะลวงเข้าสู่เซลล์พืชได้ดี และใช้ลำไอออนของอาร์กอนในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ซึ่งในปีถัดมา Anuntalabhochai *et al.* (2001) ได้ทำการทดลองส่งถ่าย พลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* โดยใช้ลำไอออนพลังงานต่ำของไนโตรเจนและอาร์กอนได้ประสบผลสำเร็จ

ไอออนบีมกับงานทางด้านเกษตรกรรม (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

ได้มีการใช้ลำไอออนพลังงานต่ำในการปรับปรุงพันธุ์ของธัญพืช ได้ทำการทดลองใช้ลำไอออนไนโตรเจนพลังงานต่ำเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวพบว่าลำไอออนก่อให้เกิดความเสียหายต่อเมล็ดข้าวต่ำ,ต้นข้าวที่ได้มีความทนทานต่อโรคสูง , ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตสั้น, ให้คุณภาพผลผลิตสูง และนำเทคนิคนี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ข้าวสายพันธุ์ใหม่ 11 สายพันธุ์ (Yu *et al.*, 1991) ต่อมา Wu and Yu (2001) ใช้ลำไอออนของไนโตรเจนอะตอมระดมยิงเมล็ดข้าวสาลี เพื่อดู Radiobiology effect โดยเฉพาะผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (Chromosome aberration) ซึ่งจากการทำ Cytological genetic พบว่าลำไอออนมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในระยะไมโตติก หรือไมโอติก ซึ่งความผิดปกตินี้จะพบมากขึ้นเมื่อใช้ปริมาณไอออนเพิ่มขึ้น ซึ่งชนิดของความผิดปกติที่พบคือ Acentric fragments , Chromosome deletions, Lagging chromosomes, Chromosome bridge และ Micronuclei โดยชนิดของความผิดปกติที่พบมากที่สุด คือ Chromosome bridge , Lagging chromosomes และFragment ส่วนลักษณะที่เกิดการกลายพันธุ์ คือ ไม่มีการสร้างเกสรตัวผู้ในส่วนของดอก ทำให้ไม่มีเมล็ด นั่นคือ ลักษณะเป็นหมัน นอกจากนี้ยังพบว่า 2% ของต้นพืชได้สูญเสียลักษณะต้านทานต่อโรค จากการศึกษาจึงได้สรุปว่าลำไอออนพลังงานต่ำมีประสิทธิภาพสูง ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช ได้มีการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ระหว่างลำไอออนของฮีเลียม, คาร์บอน และนีออน กับรังสีแกมมา โดยทำการทดลองในข้าวสาลีพบว่าลำไอออนพลังงานต่ำสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวสาลีได้ดีกว่าการใช้รังสีแกมมา

ในปีเดียวกันนี้ได้มีการใช้ ลำไอออนพลังงานต่ำในการปรับปรุงพันธุ์ในไม้ดอก โดยได้ทำการทดลองใช้ลำไอออนพลังงานต่ำของคาร์บอน และฮีเลียม ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในดอกกุหลาบ 2 สายพันธุ์คือ Orange Rosamini และ Red Minimo โดยระดมยิงลำ

ไอออนที่บริเวณตาข้างของดอก พบว่าลักษณะที่กลายพันธุ์ คือ ลักษณะของดอก , จำนวนกลีบดอก, ขนาดของดอก และสีของดอก โดยพบว่าสีของดอกที่พบจะมีสีเข้มกว่ารุ่นพ่อแม่ แต่ไม่ได้เปลี่ยนแปลงรุนแรงจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขาว หรือชมพู (Yamaguchi *et al.*, 2003) และ Okamura *et al.* (2003)ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในดอกคาร์เนชั่น

ในปีต่อมา Anuntalabhochai *et al.* (2004) ใช้ลำไอออนของไนโตรเจนที่ระดับพลังงาน 60 kV, ปริมาณไอออน 1, 4 และ $8x10^{16}$ ion/cm^2 ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวก่ำ พบว่าลักษณะที่เกิดการกลายพันธุ์คือ Leaf blade และ Stem sheath เปลี่ยนเป็นสีเขียว

จะเห็นว่าเทคนิคทางฟิสิกส์โดยเฉพาะเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำเข้ามามีบทบาทในงานทางด้านชีววิทยามากขึ้น โดยเมื่อมีเปรียบเทียบกับพลาสมา จึงทำให้ได้มีการนำพลาสมามาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยาให้มากขึ้น ซึ่งในช่วงเวลานี้ได้มีงานทดลองที่นำเทคนิคพลาสมามาใช้กับงานทางด้านชีววิทยา เช่น

งานทางด้านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้พลาสมาระดมยิงให้เกิดการแตกหักของพลาสมิด โดย Sarapirom *et al.* (2010) ได้มีการนำพลาสมามาทดลองเป็นครั้งแรก โดยมีการทดลองกับพลาสมิด pGFP ซึ่งจะมีการแสดงออกเป็นสีเขียว เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ซึ่งเมื่อถูกระดมยิงด้วยพลาสมาแล้วพบโคโลนีของแบคทีเรียเป็นสีขาว และสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพลาสมิด

Yang *et al.* (1997) ได้ทดลองนำไอออนบีมจากก๊าซไนโตรเจนไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน Ds M13mp18 DNA แล้ววิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของบริเวณของ *LacZ gene* โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบ transition (50 %) , transversion (45 %) และ deletion (5 %) ซึ่งพบว่าในการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบ transition จะพบแบบไซโตซีนไปเป็นไทมีน และ อะดีนีนไปเป็นกัวนีน ส่วนการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบ transversion พบแบบไซโตซีนไปเป็น อะดีนีน และไซโตซีนไปเป็นกัวนีน ซึ่งเหตุผลดังกล่าวเป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์

และ Quan *et al.* (2003) ได้มีการทดลองนำไอออนบีมจากก๊าซคาร์บอนไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน Ds M13mp18 DNA แล้ววิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของบริเวณของ *LacZ gene* โดยมีการเปรียบกันระหว่างสภาวะสุญญากาศกับสภาวะการชักนำ พบว่าการเปลี่ยนแปลงเพียงหนึ่งเบสคิดเป็น 96.8 % ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเกี่ยวข้องกับ base substitution โดยเฉพาะแบบ transversion (49.6 %) และ transition (39.6 %) ซึ่งผลดังกล่าวเหมือนกับการใช้รังสีแกมมาในการชักนำโดยมีการทดลองที่คล้ายกัน ซึ่งสามารถบอกได้ว่าไอออนมีผลต่อ *LacZ gene* โดยตรงไม่ใช่การสุ่ม เมื่อมีการเปรียบเทียบกับข้อมูลในการทดลองการใช้รังสีแกมมา

จะเห็นว่างานทางด้านฟิสิกส์สามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยาได้ ซึ่งจะเห็นว่าเน้นไปทางด้านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงต่าง ๆได้ ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ *LacZ* gene เป็นตัวบ่งชี้ถึงผลของพลาสมา โดย *LacZ* gene เป็นบริเวณหนึ่งที่อยู่บนพลาสมิด pUC19 ซึ่งหลักการคือเป็นการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เรียกว่า β-galactosidase เมื่อนำพลาสมิดส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ผู้รับแล้วนำเซลล์นั้นเลี้ยงบนอาหารที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและใส่สาร IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase (inducer) พร้อมกับสาร X – gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์นี้ โดยเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดจะไม่สามารถเจริญขึ้นได้ ส่วนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดจะเจริญได้และสามารถผลิตเอนไซม์ β-galactosidase โดยจะย่อยสาร X – gal เกิดเป็นสีฟ้าขึ้นทำให้มีโคโลนีเป็นสีฟ้า

ทำให้มีแนวคิดที่จะนำเทคนิคพลาสมา มาทดลองกับเรื่องการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) เป็นขั้นเริ่มต้น เพื่อที่จะใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการต่อยอดการทดลองให้สูงขึ้นต่อไป

การกลายพันธุ์ (Mutation)

หมายถึงการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสในดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) หรือเกิดจากการเหนี่ยว (Induced mutation) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอสามารถที่จะถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูกหลานได้ การกลายพันธุ์ยังอาจหมายถึงการเพิ่ม (Duplication) การขาดหาย (Deletion) ของโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงกลับทิศทางของส่วนของโครโมโซม (Inversion) หรือเกิดการย้ายสลับที่ระหว่างโครโมโซมที่ต่างคู่กัน (Translocation) หรือโครโมโซมทำให้การปรากฏลักษณะภายนอก (Phenotype) ของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไปลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่แสดงลักษณะปกติ เรียกว่า วายด์ไทป์ (Wide type)ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเปลี่ยนไป เรียกว่า ตัวกลายพันธุ์ (Mutant) สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) อาจเป็นสารเคมี หรือรังสี ทำให้เกิดการกลายได้ ซึ่งกระบวนการที่ก่อการกลายที่เกิดเองในธรรมชาติ หรือจากการเหนี่ยวนำ จะเรียกว่า กระบวนการกลายพันธุ์ (Mutagenesis)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ชนิดของการกลายพันธุ์มี 4 ระดับ

1. การกลายพันธุ์แบบเฟรมชิพด์ (Framshift mutation) การกลายพันธุ์นี้มีการเพิ่มหรือหายไปของนิวคลีโอไทด์จากโมเลกุลดีเอ็นเอเพียง 1 โมเลกุลทำให้การอ่านรหัสของพันธุกรรมเปลี่ยนไปจากเดิม เป็นผลให้โปรตีนที่สร้างจากยีนไม่สามารถทำงานได้จากปกติ

2. การกลายพันธุ์แบบพอยท์ (Point mutation หรือ gene mutation) การกลายพันธุ์ชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงหนึ่งคู่ จะเรียกว่าการกลายพันธุ์แบบพอยท์ หรือบางครั้งเรียกว่า การกลายพันธุ์แบบแทนที่ (Substitution mutation) การกลายพันธุ์แบบพอยท์ มีหลายแบบ คือ

2.1 การกลายพันธุ์แบบไซเลนท์ (Silent mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นแล้วไม่มีผลต่อลักษณะภายนอกที่ปรากฏของเซลล์นั้น ตัวอย่างเช่น เบสคู่สมเปลี่ยนไปแต่รหัส (Codon) นั้นยังคงแปลรหัสของกรดอะมิโนตัวเดิม

2.2 การกลายพันธุ์แบบมิสเซนส์ (Missense mutation) เป็นการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมมีผลให้เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในโปรตีน เช่น การเปลี่ยนเบสในสายนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 4 จากเบส G ไปเป็น A ทำให้แปลรหัสเป็นอาร์จีนีนแทนที่จะเป็นไกลซีน หรือการเปลี่ยนเบสในนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 15 จากอะดีนีนเป็นไทมีน ทำให้ได้ฟีนิลอะลานีนแทนที่จะเป็นลิวซีน นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบมิสเซนต์บางชนิดสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ในสภาวะหนึ่งแต่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในสภาวะหนึ่ง การกลายพันธุ์แบบนี้เรียกว่า condition mutation นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่เกิดแล้วทำให้โปรตีนทำหน้าที่ไม่เต็มที่ จะเรียกว่าเป็นการกลายพันธุ์แบบลิกกี้ (Leaky mutation) เช่น ในแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ทำให้ประสิทธิภาพเสียไป

2.3 การกลายพันธุ์แบบนอนเซนต์ (Nonsense mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ทั้งไม่ว่าจะเป็นการแทนที่ การเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไป ทำให้รหัสในยีนเปลี่ยนแปลงเป็นรหัสหยุดการแปลรหัส (UAG , UGA หรือ UAA) ทำสายพอลิเปปไทด์สั้น รหัสหยุดมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า นอนเซนต์ โคดอน (Nonsense codon) โดยสายพอลิเปปไทด์ที่สั้นหรือยาวกว่าปกตินี้มีผลต่อรูปร่างและการทำหน้าที่

2.4 การกลายพันธุ์แบบสับเพรสชัน (Suppression mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นแล้วไปกดการกลายพันธุ์ที่มีอยู่เดิมทำให้ได้ลักษณะ wide type กลับคืนมา เช่น เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ได้รหัสหยุดเป็นนอนเซนต์ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์อีกครั้งทำให้มีการสร้างโปรตีนต่อไปได้จนถึงรหัสหยุดที่แท้จริง (ดาวรุ่ง, 2546)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 13 ธ.ค. 2555
เลขทะเบียน 246732
เลขเรียกหนังสือ

กระบวนการเกิดการกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. การกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation)

จะมีความถี่ประมาณ 1 ในล้านที่เกิดจาก 2 ปัจจัยใหญ่ ๆ ได้แก่ ปัจจัยภายในพืช และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม

1.1 ปัจจัยภายในพืช

- **องค์ประกอบทางพันธุกรรม** เป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นในจีโนไทป์ของพืชเอง เช่น พืชที่มีการเปลี่ยนแปลงใน โครงสร้างของโครโมโซม ได้แก่ Inversion heterozygote หรือ Translocation heterozygous มีผลทำให้ได้เซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนยีนมาก หรือน้อยกว่าปกติ ในพืชบางชนิดมียีนพิเศษอยู่ในจีโนม เช่น Transposable element หรือ Transposon ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษในการเคลื่อนย้ายตำแหน่งจากโครโมโซมหนึ่งไปยังที่ตำแหน่งใด ๆ ก็ได้ในจีโนม มีผลทำให้ได้ลักษณะใหม่ออกมา เช่น การเกิดจุดสีม่วงในเมล็ด ลำต้น หรือใบของข้าวโพด

- **สภาพทางสรีระ** พบว่าในพืชมีการปลูกเปรียบเทียบระหว่างเมล็ดเก่าที่เก็บไว้เป็นเวลานาน กับเมล็ดที่เพิ่งเก็บเกี่ยว เมื่อนำเมล็ดทั้งสองชนิดมาปลูก พบว่าเมล็ดที่เก็บไว้เป็นเวลานานให้ต้นพืชที่มีการแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าต้นพืชที่ได้จากเมล็ดที่เก็บเกี่ยวใหม่ การที่เก็บเมล็ดไว้นาน ๆ ทำให้มีอัตราการกลายพันธุ์สูง ทั้งนี้เพราะในเมล็ดมีกระบวนการเมทาบอลิซึมเกิดขึ้น และมีพวกเมทาบอไลต์ และของเสียต่าง ๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ของเมล็ด สารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ขึ้นได้เองตามธรรมชาติ

1.2 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

- **อาหาร** พบว่าการปลูกพืชในแหล่งที่ขาดแร่ธาตุบางอย่างมีผลต่อการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ เช่น การปลูก Tradescantia ในดินที่ขาดแมกนีเซียม เมื่อตรวจดูโครโมโซมพบว่ามีการแตกหักของโครโมโซมมากกว่าปกติ

- **อุณหภูมิ** การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงวันหนึ่ง ๆ ถ้าสูงมาก หรือต่ำมาก อาจมีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติที่มีอยู่เดิมบริเวณนั้น

- **รังสีในสิ่งแวดล้อม** ในธรรมชาติมีแหล่งให้รังสีชนิดต่าง ๆ เช่น รังสีจากการสลายตัวของพวก Radionuclide เช่น ยูเรเนียม, ทอเรียม ซึ่งกระจายทั่วไปบนพื้นโลก และปัจจัยอย่างหนึ่งในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีรังสีคอสมิกที่มาจากนอกโลกด้วย (สิรินุช, 2540)

2. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (Induced mutation)

เป็นการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งมีหลายวิธี (Gottschalk และ Wolff, 1983) คือ

2.1 การใช้รังสี แบ่งเป็น 2 ประเภท

- รังสีที่ก่อให้เกิดไอออไนเซชัน ได้แก่ รังสีเอกซ์ , แกมมา , คอสมิก , อัลฟา , เบตา ,อิเล็คตรอน , โปรตอน , นิวตรอน และ อนุภาคอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนที่เร็ว รังสีเหล่านี้มีอำนาจทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่างๆ ได้สูง
- รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออไนเซชัน ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet) รังสีนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่างๆ ต่ำกว่ากลุ่มของรังสีที่ก่อให้เกิดไอออไนเซชัน

2.2 การใช้สารเคมี แบ่งตามปฏิกิริยาที่เข้าทำกับดีเอ็นเอ แบ่งเป็น 7 ชนิด (Milling and Wassom, 1997)

Alkylation สารเคมีกลุ่มนี้จัดว่ามีคุณสมบัติก่อการกลายพันธุ์ได้ดี ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิลเลชันกับหมู่ฟอสเฟตของเบสพิวรีน และไพริมิดีน เช่น Ethyl methane sulphonate (EMS) , Ethyleneimine (EI) และ Diethyl sulphate (dES) เป็นต้น

Arylation สารเคมีกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกสารปฏิชีวนะ และพวก Polycyclic aromatic hydrocarbon เช่น Aflatoxin B1 , Benz (a) pyrene และ Acetylaminofluorene (s-AF) เป็นต้น

Intercalation สารเคมีกลุ่มนี้ทำงานโดยแทรกตัวเข้าไปในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เช่น Actinomycin D , Acridine orange และ Acriflavin เป็นต้น

Base analogue incorporation เป็นกลุ่มของสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายกับนิวคลีโอไทด์เบส สารเคมีในกลุ่มนี้ จะเข้าไปแทนที่เบสจริงเมื่อดีเอ็นเอมีการจำลองตัวเอง เช่น 5-bromouracil (5-BU) เป็นเบส analogue ของไทมีน , 2-Aminopurine เป็นเบส analogue ของ อะดีนีน และกัวนีน

Deamination สารเคมีนี้มีความสามารถในการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโนออกไปจากเบสกัวนีน , ไทมีน , ไซโตซีน และอะดีนีนได้ ทำให้คุณสมบัติในการจับคู่เบสต่างไปจากเดิม เช่น Nitrogen acid และ Sodium bisulphate เป็นต้น

Metaphase poison สารเคมีกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทำงานคล้ายกับ Colchicines มีชื่ออื่นเรียกว่า C-mitotic agent ทำปฏิกิริยาโดยการขัดขวางการเกิดเส้นใยสปินเดิล (Spindle fiber) และขัดขวางการแยกจากกันของโครโมโซม โดยจะรวมกับโปรตีนของไมโครทิวบูวล์ (Microtubules) และยังสามารถเปลี่ยนโครงสร้างของโครโมโซม และเพิ่มจำนวนพลอยดี (Ploidy) ได้ เช่น Hydroquinole และ Vinblastin

Enzyme inhibitor สารเคมีกลุ่มนี้ทำงานโดยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเกี่ยสข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ เช่น ขัดขวางการสังเคราะห์ไทมีน ทำให้เกิดสภาวะขาดแคลนไทมีน มีผลทำให้เกิดความผิดพลาดในกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ โดยนำเบสอื่นเข้ามาแทนที่ไทมีน เป็นเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่น Caffeine , Azaserine และ Hydroxyurea เป็นต้น

2.3 การเหนี่ยวนำทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเหนี่ยวนำชักนำให้เกิดแคลลัส หรือเลี้ยงในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย เมื่อกลุ่มเซลล์ได้พัฒนาเป็นต้นพืช พบว่าพืชที่เกิดใหม่มีลักษณะแตกต่างกันไป แสดงว่าได้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมขึ้น ลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้เรียกว่า Somaclonal variation สามารถคัดเลือกลักษณะที่ดีไปใช้ประโยชน์ในการสร้างพันธุ์ใหม่ได้ (Novak, 1990)

2.4 การกลายพันธุ์เนื่องจากการสอดแทรกของดีเอ็นเอ (DNA insertional-mutation)

ชิ้นส่วนหรือลำดับเบสดีเอ็นเอที่สอดแทรกเข้าไปยังยีนมีผลทำให้การทำงานของยีนเปลี่ยนไป ทำให้ลักษณะฟีโนไทป์ที่ควบคุมยีนนั้นเปลี่ยนแปลงไปด้วย การนำลำดับดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ที่รู้จักทั่วไปคือ

Transposible element ในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่แบคทีเรียจนถึงพืช และสัตว์ พบว่ามีระดับดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน (Replication) และสามารถแยกตัวเองเคลื่อนย้ายไปสอดแทรกลำดับดีเอ็นเอของตัวเองเข้าไปยังตำแหน่งต่างของจีโนมได้ เรียกลำดับของจีโนมนี้ว่า Transposon (Fedoroff, 1982) ตัวอย่างเช่น การเกิด Vareigation เป็นลักษณะการเกิดจุดด่างเป็นลายสลับสี หรือ บริเวณกลีบของดอกพิทูเนีย . ดอกรักเร่ และการแต้มสีบนเมล็ดข้าวโพด เป็นต้น (Wessler *et al.*, 1995 ; Matsubara *et al.*, 2005)

T-DNA ในการที่ T-DNA สามารถสอดแทรกเข้าไปยังจีโนมของพืชที่บุกรุกได้ ซึ่งบางครั้งอาจสอดแทรกเข้าไประหว่างยีน ซึ่งมีผลการทำงานของยีนนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์ได้ เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเหนี่ยวนำด้วยรังสี หรือสารเคมีก่อกลายพันธุ์ ซึ่งในปี 1991 มีรายงานการนำ T-DNA เข้าไปในจีโนมของ *Arabidopsis thaliana* โดยวิธีการบ่มร่วมกันระหว่างเมล็ดที่งอกกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* พบว่าได้ Transformants มากกว่า 8,000 ชนิด และเป็นพันธุ์กลายที่แท้จริงมากกว่า 1,000 ชนิด (Feldmann, 1991)