

การประเมินประสิทธิภาพอนุภาคนาโนจากพอลิเมอร์ประจุบวกในการนำส่งยีน
สู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

นางสาวเกวลิน คลังทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

EFFICIENCY EVALUATION OF CATIONIC POLYMER-BASED NANOPARTICLES FOR
GENE DELIVERY INTO CULTURED NEURONAL CELLS

Miss Kewalin Klangthong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular

Medicine Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินประสิทธิภาพอนุภาคนาโนจากพอลิเมอร์ ประจุบวกในการนำส่งยีนสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง
โดย	นางสาวเกวลิน คลังทอง
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. ณิชฎีกา แสงกฤษฎ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. ณิชฎีกา แสงกฤษฎ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา หลายวัฒนไพศาล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต)

เกวณลิน คลังทอง : การประเมินประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนจากพอลิเมออร์ประจุบวกในการนำส่งยีนสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (EFFICIENCY EVALUATION OF CATIONIC POLYMER-BASED NANOPARTICLES FOR GENE DELIVERY INTO CULTURED NEURONAL CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. เทวิน เทนคำเนา, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. ญัฐริกา แสงกฤษฎ, 98 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ประเมินประสิทธิภาพของอนุภาคแม่เหล็กนาโน poly(methyl methacrylate) (PMMA) core/polyethyleneimine (PEI) shell nanoparticles (mag-PEI NP) เพื่อนำมาใช้เป็นตัวพาสำหรับการนำส่งยีนสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 อนุภาค mag-PEI NP สังเคราะห์ด้วยวิธี one-step emulsifier-free emulsion polymerization โดยมีอนุภาคแม่เหล็กกระจายอยู่ในตัวพาร่วมกับหมู่เอมีนจากพอลิเมออร์ประจุบวก จากนั้นตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของตัวพาด้วยการวัดขนาดและหาค่าประจุของmag-PEI NP รวมทั้งทดสอบความสามารถในการจับดีเอ็นเอด้วย DNA binding assay และตรวจสอบรูปร่างลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมด้วย atomic force microscopy การประเมินประสิทธิภาพการนำส่งยีนของ mag-PEI NP ได้ทดสอบการนำส่งที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่างการเหนี่ยวนำการนำส่งยีนด้วยแรงแม่เหล็กและปราศจากแรงแม่เหล็ก อีกทั้งได้ยืนยันการเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ของตัวพาด้วย confocal laser scanning microscopy สภาวะที่ดีที่สุดได้ถูกนำมาใช้นำส่งยีนบำบัด tryptophan hydroxylase-2 (TPH-2) เข้าสู่เซลล์ LAN-5 และตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค reverse-transcriptase polymerase chain reaction นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ศึกษาการเสริมประสิทธิภาพของตัวพาที่พัฒนา โดยใช้ TAT peptide ร่วมในระบบนำส่งยีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยีนให้ดียิ่งขึ้น

ภาควิชา.....เคมีคลินิก.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิกและ.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
อณูทางการแพทย์.....
 ปีการศึกษา.....2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

#5377202937 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : MAGNETIC NANOPARTICLES / NON-VIRAL VECTOR / GENE DELIVERY / TRYPTOPHAN HYDROXYLASE-2 (TPH-2) / NEUROBLASTOMA CELLS

KEWALIN KLANGTHONG : EFFICIENCY EVALUATION OF CATIONIC POLYMER-BASED NANOPARTICLES FOR GENE DELIVERY INTO CULTURED NEURONAL CELLS. ADVISOR : ASST.PROF.TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., CO-ADVISOR : NATTIKA SAENGRIT, Ph.D., 98 pp.

In this study, we evaluated the potential of magnetic poly(methyl methacrylate) (PMMA) core/polyethyleneimine (PEI) shell nanoparticles (mag-PEI NP) as the carrier for gene delivery into neuroblastoma cells (LAN-5). The mag-PEI nanoparticles were prepared by one-step emulsifier-free emulsion polymerization, generating highly loaded and monodispersed magnetic polymeric nanoparticles bearing an amine group. The physicochemical properties of the mag-PEI nanoparticles and DNA-bound mag-PEI nanoparticles were investigated using the DNA binding assay, atomic force microscopy and ζ -size measurements. The gene transfection efficiencies of mag-PEI nanoparticles were evaluated at different transfection times to compare between magnetic induction and non-induction. Confocal laser scanning microscopy confirmed intracellular uptake of the magnetoplex. The optimal conditions for transfection of TPH-2 were selected for therapeutic gene transfection. Finally, the mag-PEI nanoparticle magnetoplex was delivered into LAN-5 cells. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction was performed to evaluate TPH-2 expression in a quantitative manner. Moreover, we also demonstrated the use of TAT peptide incorporated in our system was significantly enhanced gene transfection efficiency.

Department : Clinical chemistry.....Student's Signature.....

Field of Study : Clinical Biochemistry and.....Advisor's Signature.....

Molecular Medicine.....

Academic Year : 2012.....Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาว์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ ดร. ณัฐริกา แสงกฤษฎ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิทยานิพนธ์ โดยที่ปรึกษาทั้งสองท่านได้ให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา กระบวนการทำงานวิจัย ต่าง ๆ ตลอดจนข้อคิดในการทำงานด้วยดีตลอดมา ดิฉันขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธาน กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรนิดา หลายวัฒนไพศาล ที่กรุณา ได้รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัย พิเนต ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความ สมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST 01-53-055) และทุนสนับสนุนการวิจัย (TRG5480020) จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ (สวทช.) ทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศไอเอ็มจี-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยี เครื่องมือในการทำวิจัยจากศูนย์นวัตกรรมเพื่อทำการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยเฉพาะทาง หอปฏิบัติทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนส่งเสริมการ วิจัยในภูมิภาคเอเชียของมูลนิธิเกาหลี่เพื่อการศึกษาชั้นสูง จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วน ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณนางสาวลักขิกา ธเนศผาติสุข นางสาววราพร รักชิตะวัฒนา ตลอดจน บุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้าน สถานที่และอุปกรณ์บางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือ เป็นแรง สนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาตลอด

ความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์และผู้มี พระคุณทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ข้อยกเว้นของการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ยีนบำบัดและระบบนำส่งยีน.....	4
2.2 การรักษาโรคทางระบบประสาทโดยใช้ยีนบำบัด.....	9
2.3 ช่องทางการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง.....	14
2.4 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอกับพอลิเมอร์ประจุบวก (DNA packaging).....	17
2.5 กลไกการเข้าเซลล์ (endocytosis).....	19
2.6 การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์โดยตัวพาประจุบวก.....	21
2.7 Cell penetrating peptides (CPPs) และ Trans-activating transcriptional peptide (TAT peptide).....	23
2.8 Tryptophan hydroxylase (TPH).....	25

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	27
3.2 การเตรียมและการตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของ magnetoplex จากอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวก PMMA/PEI core-shell magnetic nanoparticles (mag-PEI NP) จับกับพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	33
3.2.1 การเตรียม magnetoplex	33
3.2.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่าง mag-PEI NP และ พลาสมิดดีเอ็นเอด้วย DNA binding assay โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส.....	33
3.2.3 การวัดขนาดและค่าประจุของ mag-PEI NP และ magnetoplex ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS ตามหลักการ dynamic light scattering.....	33
3.2.4 ตรวจสอบรูปร่างและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ magnetoplex ด้วย atomic force microscopy (AFM).....	34
3.3 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมาก (Maxiprep).....	35
3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5.....	36
3.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5.....	36
3.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5.....	36
3.4.3 ประเมินความเป็นพิษของ mag-PEI NP ต่อเซลล์ LAN-5.....	38
3.4.4 ตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค.....	39
3.5 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของ magnetoplex ด้วย TAT peptide และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ magnetoplex /TAT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5.....	40
3.5.1 การเตรียม magnetoplex/TAT peptide.....	40
3.5.2 การวัดขนาดและค่าประจุของ magnetoplex/TAT peptide ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS ตามหลักการ dynamic light scattering.....	40
3.5.3 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของ magnetoplex ด้วย TAT peptide ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5.....	40
3.5.4 ประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของ magnetoplex /TAT ต่อเซลล์ LAN-5.....	41

3.6	ศึกษาประสิทธิภาพในการนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5.....	41
3.6.1	โคลนยีน TPH-2 และการสร้างเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีน TPH-2 (pGL3-CMV-TPH-2).....	41
3.6.2	การนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ LAN-5.....	46
3.6.3	การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยง.....	47
3.6.4	ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR.....	47
3.7	การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล.....	51
บทที่ 4	ผลการทดลอง.....	52
4.1	การเตรียมและการตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของ magnetoplex จาก อนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวก PMMA/PEI core-shell magnetic nanoparticles (mag-PEI NP) จับกับพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	52
4.1.1	ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่าง mag-PEI NP และ พลาสมิดดีเอ็นเอด้วย gel retardation assay.....	52
4.1.2	ขนาดและค่าประจุของ mag-PEI NP และ magnetoplex จากการวัดด้วย เครื่อง Zetasizer Nano ZS ตามหลักการ dynamic light scattering.....	53
4.1.3	ผลการตรวจสอบรูปร่างและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ magnetoplex ด้วย atomic force microscopy (AFM)	54
4.2	ศึกษาประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ใน เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5.....	55
4.2.1	ผลการประเมินประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนเข้าสู่ เซลล์ LAN-5.....	55
4.2.2	ผลการประเมินความเป็นพิษของ mag-PEI NP ต่อเซลล์ LAN-5.....	56
4.3	ผลการตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค.....	59
4.4	การเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของ magnetoplex ด้วย TAT peptide และ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ magnetoplex /TAT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5.....	65
4.4.1	ขนาดและค่าประจุของ magnetoplex/TAT peptide จากการวัดด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS ตามหลักการ dynamic light scattering.....	65

4.4.2 ผลการเสริมประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5 ด้วย TAT peptide.....	67
4.4.3 ผลการประเมินความเป็นพิษของ magnetoplex /TAT ต่อเซลล์ LAN-5.....	67
4.5 การนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วย magnetoplex และ magnetoplex/TAT.....	70
4.5.1 การโคลนยีน TPH-2 และการสร้างเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีน TPH-2 (pGL3-CMV-TPH-2).....	70
4.5.2 ผลการแสดงออกของยีน TPH-2 จากการตรวจสอบโดยเทคนิค RT-PCR.....	72
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	78
รายการอ้างอิง.....	85
ภาคผนวก.....	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	98

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ไวรัสที่ใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง.....	11
ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ.....	48
ตารางที่ 3.2 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อสร้าง cDNA จากอาร์เอ็นเอ.....	49
ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจศึกษา.....	50
ตารางที่ 3.4 ลำดับเบสของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้สำหรับการโคลนยีนและตรวจสอบการ แสดงออกของยีน.....	50
ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจวัดขนาดและประจุของอนุภาค mag-PEI NP และ mag-PEI NP/DNA magnetoplex ตั้งแต่ N/P 0.4-17.5.....	54
ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจวัดขนาดและประจุของ mag-PEI NP/DNA (magnetoplex) และ magnetoplex/TAT peptide.....	66

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 การนำส่งยีนโดยใช้แรงแม่เหล็กเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของอนุภาคแม่เหล็กนาโน (magnetofection).....	8
ภาพที่ 2.2 บริเวณต่าง ๆ ที่ใช้เป็นช่องทางในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาท.....	15
ภาพที่ 2.3 การเกิด proton sponge effect.....	16
ภาพที่ 2.4 mag-PEI NP จากการตรวจสอบโดยใช้ TEM.....	17
ภาพที่ 2.5 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอกับพอลิเมอร์ประจุบวกแบบ electrostatic interaction, encapsulation และ adsorption.....	18
ภาพที่ 2.6 กลไกการเข้าเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ.....	20
ภาพที่ 2.7 กลไกการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์โดยพอลิเมอร์ประจุบวก.....	22
ภาพที่ 2.8 กลไกการเข้าสู่เซลล์ของ cell penetrating peptides (CPPs).....	24
ภาพที่ 2.9 กระบวนการสังเคราะห์และสลายซีโรโทนิน.....	26
ภาพที่ 3.1 พลาสมิด pGL-3-basic ที่บรรจุ CMV promoter/enhancer และยีน firefly luciferase reporter.....	36
ภาพที่ 3.2 การเกิดปฏิกิริยา bioluminescent จาก firefly luciferase.....	37
ภาพที่ 3.3 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสี Coomassie Brilliant Blue G-250 กับโปรตีน.....	38
ภาพที่ 3.4 การเกิดปฏิกิริยา oxidation โดยเอนไซม์ mitochondrial reductase.....	39
ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์.....	44
ภาพที่ 4.1 การจับกันระหว่าง mag-PEI NP และพลาสมิดดีเอ็นเอที่อัตราส่วน N/P ต่าง ๆ ด้วย DNA binding assay.....	52
ภาพที่ 4.2 รูปร่างของและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ magnetoplex ภายใต้อการตรวจสอบโดย AFM.....	55
ภาพที่ 4.3 A การประเมินประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของ mag-PEI NP ในรูปแบบของ magnetoplex ที่ N/P 0.4-17.5 เมื่อเหนี่ยวนำการถ่ายโอนที่เวลา 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที.....	57

ภาพที่ 4.3 B การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ LAN-5 ของ mag-PEI NP ในรูปแบบของ magnetoplex ที่ N/P 0.4-17.5 เมื่อเหนี่ยวนำการถ่ายโอนที่เวลา 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที.....	58
ภาพที่ 4.4 การตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค mag-PEI NP ภายใต้กล้อง CLSM.....	60
ภาพที่ 4.5 การตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค mag-PEI NP ภายใต้กล้อง CLSM โดยใช้รูปแบบ Z-stack.....	61
ภาพที่ 4.6 ภาพจำลองแสดงการจับกันระหว่าง mag-PEI NP, ดีเอ็นเอ และ TAT peptide ด้วยหลักการ layer-by-layer coating.....	66
ภาพที่ 4.7 A การเสริมประสิทธิภาพของ magnetoplex /TAT peptide ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5.....	68
ภาพที่ 4.7 B การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ LAN-5 ของ magnetoplex /TAT peptide....	69
ภาพที่ 4.8 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน TPH-2.....	70
ภาพที่ 4.9 การตรวจสอบโคลน pGEM-T™-TPH2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NheI</i> และ <i>XbaI</i> ...	71
ภาพที่ 4.10 การตรวจสอบโคลน pGL3-CMV-TPH-2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i> และ <i>XbaI</i>	72
ภาพที่ 4.11 A ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 และยีนควบคุม GAPDH หลังจากการถ่ายโอนยีนที่เวลา 18 ชั่วโมง	74
ภาพที่ 4.11 B ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 และยีนควบคุม GAPDH หลังจากการถ่ายโอนยีนที่เวลา 24 ชั่วโมง	74
ภาพที่ 4.11 C ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 และยีนควบคุม GAPDH หลังจากการถ่ายโอนยีนที่เวลา 3 วัน.....	74
ภาพที่ 4.11 D ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 และยีนควบคุม GAPDH หลังจากการถ่ายโอนยีนที่เวลา 7 วัน.....	75
ภาพที่ 4.12 ผลแสดงออกของยีน TPH-2 เมื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณจากการตรวจสอบโดยเทคนิค RT-PCR ที่ช่วงเวลา 18, 24 ชั่วโมง 3 และ 7 วัน.....	76

ภาพที่ 4.13 ผลแสดงออกของยีน TPH-2 จากการตรวจสอบโดยเทคนิค RT-PCR เมื่อถ่ายโอนยีนเป็นเวลา 18, 24 ชั่วโมง, 3 และ 7 วัน โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้ mag-PEI NP และ mag-PEI NP/TAT peptide เป็นตัวพา.....	77
ภาพที่ 5.1 ภาพจำลองแสดงการจับกันระหว่าง mag-PEI NP และดีเอ็นเอ เกิดการฟอร์มเป็น magnetoplex ด้วยแรง electrostatic interaction.....	79
ภาพที่ 5.2 ผลการวัดขนาดและค่า ζ -potential ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS เปรียบเทียบ ระหว่าง mag-PEI NP, magnetoplex N/P0.8 และ magnetoplex N/P 0.8/TAT 5 $\mu\text{g/ml}$	83

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคจิตประสาทจำนวนมากที่รอความหวังจากผลการศึกษากลไกในการก่อพยาธิสภาพและการรักษาด้วยยีนบำบัด การศึกษาในศาสตร์นี้ก้าวหน้าเพียงใด ย่อมก่อให้เกิดความหวังแก่ผู้ป่วยมากทิวคณ ปัจจุบันสำคัญในการพัฒนางานทางด้านยีนบำบัดให้ประสบผลสำเร็จประการหนึ่งคือการพัฒนาาระบบนำส่งยีนให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทให้มีประสิทธิภาพสูงเป็นเรื่องยาก ดังนั้น จึงมีคณะวิจัยต่าง ๆ สนใจและพยายามคิดค้นหาทางเลือกเกี่ยวกับระบบนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพื่อให้สัมฤทธิ์ผลสูงสุด อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีเทคนิคที่ดีที่สุดในการนำส่งยีนสู่เซลล์ประสาท ในขณะที่กลุ่มพอลิเมอร์ประจุบวก เช่น โคโตซาน หรือ พอลิเอทิลีนอิมิน (polyethyleneimine, PEI) ได้รับความสนใจมากขึ้นในระดับนวัตกรรมนาโนเทคโนโลยีในปัจจุบัน นอกจากนี้ การใช้พอลิเมอร์ประจุบวกในการนำส่งยีนยังเป็นการพัฒนาระบบนำส่งแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา (non-viral gene delivery system) ซึ่งเป็นทางเลือกที่ดีกว่าเมื่อคำนึงถึงความปลอดภัยเมื่อเปรียบเทียบกับการนำส่งยีนที่อาศัยไวรัส (viral-mediated gene delivery system) แม้ว่าการนำส่งยีนแบบอาศัยไวรัสนั้นจะมีประสิทธิภาพเหนือกว่าก็ตาม การใช้พอลิเมอร์เหล่านี้จัดว่ามีความปลอดภัยสูง ราคาไม่แพง เตรียมง่าย สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก อีกทั้งยังมีความเข้ากันได้ทางชีววิทยา (biocompatibility) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (low cytotoxicity) กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่ำ (low immunogenicity) และสามารถป้องกันการถูกทำลายของดีเอ็นเอจากเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสในซีรัมได้ (1) สำหรับงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมุ่งพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของระบบนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเพื่อนำส่งยีนสำหรับสังเคราะห์ทริปโตเฟน Tryptophan hydroxylase-2 (TPH-2) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการสังเคราะห์สารสื่อประสาทซีโรโทนิน (2, 3) ทั้งนี้จะประเมินการนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง human neuroblastoma cells (LAN-5) โดยใช้ตัวพาเป็นอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวกชนิด PMMA/PEI core-shell magnetic nanoparticles (mag-PEI NP) ซึ่งอนุภาคกลุ่มนี้ได้รับการสังเคราะห์โดย Pimpha และคณะ, 2012 (4) มี poly (methyl methacrylate) (PMMA) เป็นแกนกลางหุ้มด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก PEI และมีส่วนผสมของ iron oxide กระจายอยู่ภายในอนุภาค อนุภาคที่ได้รับการพัฒนาขึ้นใหม่นี้ไม่เคยมีการศึกษามาก่อนถึงประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสู่เซลล์ประสาทและมีต้นทุนในการผลิตต่ำ เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีน คณะผู้วิจัยคาดหวังว่าอนุภาคชนิดนี้จะ

ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนได้ ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคมี PEI ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประจุบวก เป็นองค์ประกอบ ทำให้ผิวของอนุภาคสามารถจับกับประจุลบของดีเอ็นเอได้ อีกทั้งยังมีลักษณะเด่นคือมีสารเหล็ก iron oxide อยู่ในอนุภาค สามารถกระตุ้นอนุภาคให้เคลื่อนที่เข้าสู่ภายใน เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงภายใต้อิทธิพลของแรงแม่เหล็ก เป็นการเร่งการตกและทำให้ อนุภาคสัมผัสกับผิวเซลล์ได้รวดเร็ว ทำให้สามารถช่วยประหยัดเวลาในการนำส่งยีนและลดปริมาณ ของดีเอ็นเอที่ต้องการนำส่งได้ ที่สำคัญก็คือ เทคนิคนี้ยังสามารถพัฒนานำไปใช้สำหรับการนำส่ง อย่างมีเป้าหมายในสภาวะร่างกาย (in vivo) ด้วยการเหนี่ยวนำอนุภาคให้เคลื่อนที่สู่อวัยวะหรือ บริเวณที่ต้องการด้วยการเหนี่ยวนำของแรงแม่เหล็กจากภายนอก (5)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโน mag-PEI NP ในการนำส่งยีน ทั้งนี้จะประเมินประสิทธิภาพในการนำส่งยีนและตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ภายหลังการนำส่งยีน เปรียบเทียบกับชุดนำยาถ่ายโอนทางการค้าและ เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งโดยการเหนี่ยวนำและไม่เหนี่ยวนำด้วยแรงแม่เหล็กในการนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง อนึ่ง กลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวกนี้จะ ถูกส่งเคราะห์ขึ้นใหม่โดยคณะผู้วิจัย ณ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เพื่อศึกษาระบบนำส่งยีนสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบซีโรโทเนอร์จิกในระบบประสาท เพื่อพัฒนาให้เกิดองค์ความรู้ ใหม่และพัฒนาระบบนำส่งยีนไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคโดยใช้ยีนบำบัดได้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความเป็นพิษของอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ ประจุบวกภายหลังการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง โดยใช้ยีนเครื่องหมาย

1.2.2 ศึกษาการเสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากอนุภาค ที่เตรียมได้โดยใช้ TAT peptide

1.2.3 ทดสอบนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงและตรวจสอบผลการนำส่ง ด้วยการวัดการแสดงออกของ TPH-2 ด้วยเทคนิค reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้รูปแบบทดลองแบบ *in vitro* โดยศึกษาระบบนำส่งยีนสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นต้นพา ซึ่งจะทำการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพและประเมินประสิทธิภาพอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวก พร้อมทั้งทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเซลล์ต้นแบบในการทดลอง นอกจากนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพและความเป็นพิษของ TAT peptide เพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพในการนำส่งยีน จากนั้นรูปแบบและสภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่สุดจะถูกนำมาทดสอบการนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ LAN-5 ต่อไป

1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้รูปแบบการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) ใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเป็นต้นแบบในการศึกษา โดยใช้แท่นแม่เหล็ก MagnetoFACTOR-96 plate (Chemicell, Berlin, Germany) ช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีน ซึ่งในการทดลองควรหลีกเลี่ยงการวางแท่นแม่เหล็กใกล้กับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และเป็นการทดลองเพียงแบบจำลองเบื้องต้น หากมีการพัฒนานำไปใช้ในร่างกาย (*in vivo*) ควรพัฒนาอุปกรณ์ที่ช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนด้วยแรงแม่เหล็กให้มีความจำเพาะมากขึ้น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับการพัฒนาระบบนำส่งยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นต้นพา ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำ

1.5.2 พัฒนางานวิจัยในขั้นพื้นฐานเพื่อต่อยอดงานวิจัยในระดับที่สูงอันมีเป้าหมายเพื่อประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคโดยยีนบำบัดให้มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังสามารถนำอนุภาคในกลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ในด้านอื่น ๆ เช่น การนำส่งยา หรือการตรวจวินิจฉัยโรคด้วย magnetic Resonance Imaging (MRI)

1.5.3 พัฒนาการใช้ต้นพาในกลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวกชนิดใหม่ที่มีความเหมาะสมในการนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ประสาท เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคจิตประสาทโดยใช้ยีนบำบัด

1.5.4 คาดว่าจะตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้องได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยีนบำบัดและระบบนำส่งยีน

ยีนบำบัดเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรค โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุจากความบกพร่องของระบบพันธุกรรม โดยความหมายแล้วการรักษาด้วยยีนบำบัดหมายถึง การรักษาโรคหรือความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยทำการนำส่ง เพิ่ม หรือแก้ไขยีนที่มีความบกพร่องด้วยยีนที่ปกติ (6) นอกจากนี้การแก้ไขความบกพร่องของยีนแล้ว การรักษาด้วยยีนบำบัดยังมีความหมายถึงการรักษาโรคด้วยการนำส่ง plasmid DNA, antisense oligonucleotides หรือ siRNA เพื่อยับยั้งไม่ให้ร่างกายผลิตโปรตีนบางชนิดที่ไม่ต้องการ (antisense therapy) เช่น การนำส่ง antisense HIV-1 envelope gene เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส HIV (7) หรือการนำส่ง siRNA เพื่อยับยั้งการแสดงออกของ oncogene ซึ่งอาจก่อให้เกิดการพัฒนาเป็นโรคมะเร็งได้ในอนาคต (8)

การรักษาโรคด้วยยีนบำบัดประสบความสำเร็จครั้งแรกในปี ค.ศ. 1995 โดย Blaese และคณะ (9) ได้นำส่งยีนสังเคราะห์เอนไซม์ adenosine deaminase (ADA) เพื่อรักษาผู้ป่วย severe combined immunodeficiency (ADA-SCID) โดยใช้ retrovirus เป็นตัวพา ความสำเร็จในการรักษาด้วยยีนบำบัดในครั้งนั้นได้ทำให้นักวิจัยทั่วโลกหันมาสนใจการใช้เทคโนโลยียีนบำบัดรักษาโรคเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การรักษาด้วยยีนบำบัดจำเป็นต้องมีระบบการนำส่งยีนที่มีประสิทธิภาพ มีเทคนิคในการนำส่งยีนที่ดีและอาศัยตัวพาที่มีประสิทธิภาพช่วยในการนำส่งยีนเพื่อให้ชิ้นส่วนที่จะนำส่งสามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่ต้องการแก้ไขได้อย่างจำเพาะ ซึ่งลักษณะของตัวพาที่ดีที่จะทำให้การรักษาด้วยยีนบำบัดประสบความสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เป้าหมาย ความสามารถในการปกป้องสารพันธุกรรมจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ ความสามารถในการปลดปล่อยและควบคุมการแสดงออกของยีนในระยะเวลาที่ต้องการ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ทำให้ไม่เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีผลข้างเคียงน้อยและมีความปลอดภัยสูง สำหรับเทคนิคหลักที่ได้รับความนิยมในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถจำแนกได้ 2 วิธี ดังนี้

2.1.1 ระบบนำส่งยีนแบบอาศัยไวรัสเป็นตัวพา (viral-mediated gene delivery system)

เทคนิคแรกเป็นระบบการนำส่งยีนแบบอาศัยไวรัสเป็นตัวพา ไวรัสที่นิยมใช้ได้แก่ retrovirus และ adenovirus ซึ่งมีการทดลองใช้ทางคลินิกแล้วพบว่ามีประสิทธิภาพในการนำส่ง

ยืนสูง แต่อย่างไรก็ตามการนำส่งยีนโดยอาศัยไวรัสเป็นตัวพานั้นก็ยังมีข้อเสียอยู่มาก ทั้งในเรื่องของความเป็นพิษต่อเซลล์และการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อนำมาทดสอบในระบบ *in vivo* นอกจากนี้ ขั้นตอนในการเตรียมไวรัส เพื่อใช้ในการนำส่งนั้นยังมีความยุ่งยากซับซ้อน ต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการทดลองและมีข้อจำกัดในเรื่องขนาดสารพันธุกรรมที่จะให้นำส่งอีกด้วย (10, 11)

2.1.2 ระบบนำส่งแบบยีนไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา (non-viral gene delivery system) สามารถจำแนกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.1.2.1 วิธีทางเคมี (chemical methods)

(1) DEAE-dextran เป็นพอลิเมอร์ประจุบวก ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับประจุลบของดีเอ็นเอเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีประจุรวมทั้งหมดเป็นบวก ทำให้จับกับประจุลบของเยื่อหุ้มเซลล์และนำส่งสารพันธุกรรมหรือสิ่งที่สนใจเข้าสู่เซลล์ได้โดยวิธีเอนโดไซโตซิส (endocytosis) (12) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาดมีชื่อการค้า เช่น Profection[®] Mammalian Transfection System-DEAE-dextran System (Promega, WI, USA)

(2) แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) เป็นชุดน้ำยาชนิดหนึ่งที่ใช้ในการนำส่งสารพันธุกรรมที่สนใจเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย โดยการนำดีเอ็นเอที่จะนำส่งผสมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์แล้วเติมสารละลายนี้ลงในสารละลายฟอสเฟต ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องจะเกิดตะกอนขึ้นแล้วจึงนำตะกอนนี้มาส่งเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ตะกอนซึ่งมียีนที่เราสนใจอยู่จะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยวิธีเอนโดไซโตซิส (13) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาดมีชื่อการค้า เช่น Profection[®] Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate (Promega, WI, USA)

(3) สารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมประจุบวกกับดีเอ็นเอ (cationic liposome-DNA complex หรือ lipoplex) นิยมเตรียมไลโปโซมโดยใช้ไขมันที่มีประจุบวกรวมกับไขมันที่เป็นกลาง เช่น Dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) หรือ คลอเลสเทอรอล ซึ่ง DOPE จะทำหน้าที่ช่วยในการรวมตัวของสารประกอบเชิงซ้อนของไลโปโซม-ดีเอ็นเอกับเอนโดโซม มีผลทำให้การปลดปล่อยยีนจากเอนโดโซมไปที่ไซโตพลาสซึมง่ายขึ้น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 Felgner และคณะ (14) ได้มีการพัฒนาไลโปโซมประจุบวกหลายชนิด สูตรที่ใช้มากที่สุดคือ DOTMA/DOPE (Lipofectin[®]) จาก (Invitrogen, CA, USA)

(4) สารประกอบเชิงซ้อนพอลิเมอร์ประจุบวกกับดีเอ็นเอ (cationic polymer-DNA complex หรือ polyplex) พอลิเมอร์ประจุบวกตัวแรกที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวพาดีเอ็นเอคือกลุ่ม

polyamino acid ที่นิยมใช้คือ poly-L-lysine (PLL) (15), polyamidoamine dendrimers (PAMAM) (16), polyethyleneimine (PEI) (17) และโคโตซาน (18)

อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยหลายฉบับได้ศึกษาการใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ เช่น calcium phosphate (19), liposome (20), DEAE-dextran (21) ในการนำส่งยีน พบว่า วิธีนี้มีข้อเสียแตกต่างกันไป ได้แก่ ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนต่ำ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีการแสดงออกของยีนในระยะสั้น น้ำยาที่ส่งจากต่างประเทศมีราคาแพงและน้ำยาหมดอายุเร็วภายหลังการเปิดใช้ เป็นต้น

2.1.2.2 วิธีทางกายภาพ (physical methods)

(1) Microinjection เป็นวิธีการนำส่งยีนที่จะฉีดดีเอ็นเอเปล่า (naked DNA) เข้าสู่เซลล์หรือนิวเคลียสของเซลล์โดยตรง วิธีนี้ต้องอาศัยเข็มและอุปกรณ์พิเศษช่วยในการควบคุมการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (22) นอกจากนี้ ในการนำส่งต้องฉีดดีเอ็นเอเข้าเซลล์ที่ละเซลล์นั้นทำได้ยาก ต้องอาศัยบุคคลที่มีความเชี่ยวชาญจึงจะทำให้การนำส่งยีนประสบความสำเร็จ นิยมทำในเซลล์ต้นกำเนิด เช่น เซลล์ไข่หรือเซลล์อสุจิ

(2) Sonoporation เป็นการใช้คลื่นความถี่สูง (ultrasonic frequency) เพื่อนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ มีหลักการคือ การใช้คลื่นความถี่สูงมาทำลายให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรู ทำให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น

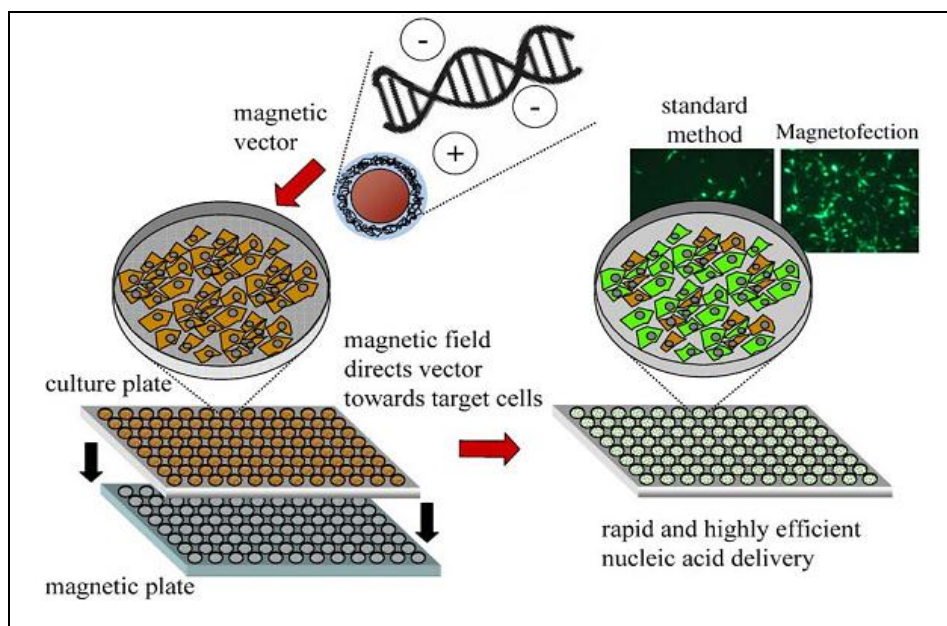
(3) Gene gun (microprojectile bombardment หรือ biolistic technique) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1987 โดย Klein และคณะ (23) ในครั้งแรกนั้นได้นำส่งยีนที่ทำให้เกิดการแสดงออกในเซลล์พืช จนกระทั่งช่วงปี ค.ศ. 1990 Yang และคณะ (24) จึงมีการทดลองใช้ gene gun นำส่งยีนเข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรก เทคนิคนี้เป็นการนำส่งยีนโดยอาศัยการยิงพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมายด้วยเครื่องมือพิเศษที่เรียกว่า gene gun ซึ่งอาศัยการทำงานของความต่างศักย์ไฟฟ้าแรงให้อนุภาคเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงแทรกเข้าสู่อวัยวะ เนื้อเยื่อหรือเซลล์เป้าหมายได้อย่างแม่นยำ โดยจะเคลือบอนุภาคทองคำหรือทังสเตนบนยีนที่จะนำส่งเพื่อให้สามารถปรับความเร็วในการยิง ความหนาแน่นและขนาดของอนุภาคให้เหมาะสมกับเซลล์เป้าหมายได้

(4) Electroporation การนำส่งยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า เริ่มใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1982 โดย Neumann และคณะ (25) ได้ทดลองใช้เทคนิคนี้ในการนำส่งยีนเข้าสู่ mouse lymphoma cells อาศัยหลักการคือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นโพรงหรือช่อง ด้วยการจ่ายกระแสไฟฟ้าที่แรงและเร็วแก่เซลล์ ศักย์ไฟฟ้าเคมีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหัน ความต่างศักย์ที่เกิดขึ้น

ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์จะทำให้ lipid bilayer เกิดการเปลี่ยนแปลง เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณนั้นจึงเกิดช่องว่างสามารถนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้

(5) Laser irradiation เป็นเทคนิคในการนำส่งยีนโดยใช้แสงเลเซอร์เป็นแหล่งกำเนิดแสง เมื่อลำแสงตกกระทบกับเซลล์จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง เกิดเป็นช่องว่างทำให้สามารถนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ในการนำส่งยีนเนื่องจากเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง

(6) Magnetofection เป็นเทคนิคการนำส่งยีนโดยอาศัยแรงแม่เหล็กจากภายนอก (external magnetic field) เหนี่ยวนำการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย โดยใช้อนุภาคนาโนที่มีส่วนผสมของเหล็กเป็นตัวพา อนุภาคแม่เหล็กนาโนจะจับกับดีเอ็นเอเกิดเป็น “magnetoplex” และถูกเหนี่ยวนำให้เคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้ภายใต้อิทธิพลของแรงแม่เหล็ก ในปี ค.ศ. 2002 Mah และคณะ (26) ได้ทดลองใช้อนุภาคนาโนที่มีส่วนผสมของเหล็กในการนำส่งยีนเป็นครั้งแรก เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งโดยใช้ไวรัสผสมกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนและการใช้ไวรัสเพียงอย่างเดียว พบว่า การใช้ไวรัสและอนุภาคแม่เหล็กนาโนร่วมกันจะมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงกว่าการใช้ไวรัสเป็นตัวพาเพียงอย่างเดียว ซึ่งให้ผลเหมือนกันทั้งการทดลองใน *in vitro* และ *in vivo* จึงเรียกรวมการนำส่งยีนโดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนเป็นตัวพาและใช้แรงแม่เหล็กในการเหนี่ยวนำการนำส่งว่า “magnetofection” (27) (ภาพที่ 2.1) เทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย สามารถประยุกต์ใช้ได้กับทั้งระบบนำส่งยีนแบบอาศัยไวรัสและไม่อาศัยไวรัส เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนมากกว่าการใช้ไวรัสหรือการใช้ตัวพาชนิดอื่นเพียงแต่เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 2.1 การนำส่งยีนโดยใช้แรงแม่เหล็กเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของอนุภาคแม่เหล็กนาโน (magnetofection) (28)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคผสม (hybrid method) ระหว่างการใช้วิธีทางเคมีและวิธีทางกายภาพในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ เช่น งานวิจัยของ Namgung และคณะ, 2010 (29) ทดลองใช้ออนุภาคผสมระหว่าง superparamagnetic nanoparticle (SPIONs) และ branched polyethylenimine (BPEI) ในการนำส่งยีน IL-10 เข้าสู่ vascular endothelial cells โดยใช้แรงแม่เหล็กจากภายนอกเหนี่ยวนำการถ่ายโอน ผลการทดลองพบว่ายีนที่นำส่งเข้าไปสามารถผลิตไซโตไคน์ IL-10 เพิ่มมากขึ้น ทำให้การแสดงออกของ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ลดลง การนำส่งยีนเพื่อไปลดการแสดงออกของ PAI-1 นี้มีความสำคัญอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้รักษาผู้ป่วยหลอดเลือดและหัวใจ ซึ่งมีสาเหตุสำคัญมาจากการทำงานของ PAI-1 ที่มากเกินไปทำให้เกิดลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดหัวใจ พบว่าการใช้หลักการ magnetofection ในการนำส่งยีน เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ประหยัดเวลาในการนำส่งยีน ทำให้ระยะเวลาในการสัมผัสกับแอนไซม์ในซีรัมลดลง ดีเอ็นเอที่ต้องการนำส่งจึงไม่ถูกทำลายก่อนที่จะเข้าไปถึงเซลล์เป้าหมาย

ในปี ค.ศ. 2008 Pan และคณะ (30) ทดลองใช้ออนุภาคผสมระหว่าง cationic lipid-coated magnetic nanoparticles (MPs) และ PEI ในการนำส่งยีน พบว่าการใช้ออนุภาคผสมนี้มีประสิทธิภาพในการนำส่งเพิ่มขึ้นสูงกว่า 300 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ cationic liposome

หรือ PEI เพียงอย่างเดียว โดยใช้เวลาเพียงแค่ 15 นาทีเห็นย่นำการนำส่งยีนภายใต้อิทธิพลของแรงแม่เหล็ก นอกจากนี้ มีการประยุกต์ใช้ magnetofection ในงานวิจัยด้านภูมิคุ้มกัน ในปี ค.ศ. 2011 Deen และคณะ (31) ทำการทดลองใช้ SPIONs ที่หุ้มด้วย PEI นำส่ง malaria DNA vaccine ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วยแรงแม่เหล็ก พบว่า SPIONs-PEI เป็นตัวพาที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงและมีความเป็นพิษใกล้เคียงกับชุดนำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, CA, USA)

2.2 การรักษาโรคทางระบบประสาทโดยใช้ยีนบำบัด

ปัจจุบัน นักวิจัยได้พยายามศึกษาถึงกลไกและวิธีการรักษาโรคทางระบบประสาทเพิ่มมากขึ้น การรักษาโดยใช้ยีนบำบัดจึงเป็นศาสตร์อีกแขนงหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทสำคัญช่วยในการรักษาผู้ป่วยโรคจิตประสาทได้ มีงานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาเกี่ยวกับการรักษาโรคจิตประสาทโดยใช้ยีนบำบัด ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาโดยใช้สัตว์ทดลองหรือเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (32, 33) แต่อย่างไรก็ตาม การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทให้มีประสิทธิภาพสูงเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก ดังนั้นจึงมีคณะวิจัยต่าง ๆ สนใจและพยายามค้นหาทางเลือกและพัฒนาระบบนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพื่อให้สัมฤทธิ์ผล ในระยะแรกมีการทดลองใช้ระบบนำส่งยีนแบบอาศัยไวรัส ไวรัสที่มีการทดลองใช้นำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางมีหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น adeno-associated virus (AAV), recombinant adenovirus, herpes-Simplex virus (HSV), retrovirus และ lentivirus (LV) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.2.1 ตัวพาที่ใช้ในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางแบบอาศัยไวรัส

2.2.1.1 Adeno-associated virus (AAV)

AAV เป็นดีเอ็นเอไวรัสชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้นำส่งยีนอย่างแพร่หลาย ไวรัสชนิดนี้เข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับที่จำเพาะต่อส่วนแคปซิดของเชื้อไวรัส คือ heparan sulfate proteoglycans (HSPG) ซึ่งเป็นโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สามารถนำส่งสารเข้าสู่เซลล์ได้ (34) AAV ในแต่ละซีโรไทป์จะมีความจำเพาะกับแต่ละบริเวณในสมองต่างกัน ทำให้มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนแตกต่างกัน เช่น ยีนที่ถูกนำส่งเข้าสู่ระบบประสาท โดยมี AAV- 2 เป็นตัวพาจะถูกนำส่งเข้าสู่บริเวณ substantia nigra ได้ดีกว่าบริเวณ striatum (35) มีการทดลองทางคลินิกใช้ AAV-2 ในการนำส่ง human ASPA cDNA เข้าสู่สมองบริเวณ subcortical เพื่อรักษาโรค Canavan ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ aspartoacylase (ASPA) ทำให้มีการสะสมของ N-acetylaspartate (NAA) ส่งผลให้เยื่อหุ้มไมอีลินเกิดความผิดปกติ ในระยะแรกมีการทดลองรักษาผู้ป่วยเด็ก 20 ราย พบว่า ภายหลังจากการรักษาการดำเนินโรคเกิดขึ้นช้าลงและมีการ

สะสมของ NAA น้อยลง (36) นอกจากนี้ ยังมี AAV ซีโรไทป์อื่นที่นำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง เช่น AAV-4, AAV-5 และ AAV-8 ไวรัสนี้มีความเป็นพิษน้อย แต่ก็ยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนเนื่องจากมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดี อีกทั้งมีระยะในการแสดงออกของยีนช้า ต้องใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์จึงเกิดการแสดงออกของยีน (37)

2.2.1.2 Recombinant adenovirus (rAV)

rAV เป็นไวรัสที่ถูกพัฒนาจาก adenovirus ที่มีการกำจัดจีโนมในส่วนที่ใช้เพิ่มจำนวนออกไปและใส่ยีนที่ต้องการจะนำส่งเข้าไปแทนที่ ทำให้โปรตีนที่จะเข้าไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมีประสิทธิภาพลดลง ระบบภูมิคุ้มกันจึงมีการตอบสนองน้อยลงและทำให้มีการแสดงออกของยีนในระยะเวลานานมากขึ้น (38)

2.2.1.3 Herpes-Simplex virus (HSV)

HSV เป็นดีเอ็นเอไวรัสที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูง HSV-1 เป็นซีโรไทป์ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีน ซึ่งมีการพัฒนารูปแบบที่เป็นรีคอมบิเนนต์ไวรัสและแอมพลิคอนขึ้นมา พบว่ามีความเป็นพิษและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายน้อยกว่าในรูปแบบที่เป็น HSV-1 vector นอกจากนี้ HSV ยังมีคุณสมบัติในการเป็น oncolytic virus กล่าวคือสามารถทำลายเนื้องอกได้ จึงมีนักวิจัยได้ทดลองใช้ HSV ในการรักษาเนื้องอกในสมอง (39) อย่างไรก็ตามไวรัสนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากยีนที่นำส่งจะมีการแสดงออกของยีนในระยะเวลาที่สั้นและไม่มีความไม่เสถียรของยีนที่นำส่งเข้าไป

2.2.1.4 Retrovirus

retrovirus เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว การเข้าสู่เซลล์เป้าหมายจะอาศัยความจำเพาะระหว่างโปรตีนบนไวรัสและตัวรับที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สามารถแทรกผ่านเข้าสู่ส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์เป้าหมายได้ จากนั้นเอนไซม์ reverse transcriptase จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอ เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์และเพิ่มจำนวนแทรกสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสรวมกับโฮสต์เซลล์ ทำให้เกิดอันตรายได้ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาตัวพาขึ้นใหม่โดยอาศัยสารพันธุกรรมจากเชื้อ retrovirus เพียงบางส่วนเท่านั้น เช่น murine moloney leukemia virus (MoMLV) เป็นไวรัสที่มีการทดลองใช้ทางคลินิกในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ โดยทำการทดลองกับผู้ป่วย 8 ราย และใช้ MoMLV เป็นตัวพานำส่งยีนที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ nerve growth factor (NGF) ได้เป็นผลสำเร็จ (40) นอกจากนี้

มีการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยใช้ MoMLV เป็นตัวพาในการนำส่งยีนเพื่อรักษา spinal cord injury ซึ่งเป็นการทดลองแบบ *ex vivo* therapy (41)

2.2.1.5 Lentivirus

lentivirus เป็นเชื้อไวรัสที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกับ retrovirus มีจีโนมบางส่วนที่คล้ายกับ retrovirus แต่ก่อให้เกิดอันตรายน้อยกว่า มีการทดลอง พบว่า ยีนที่ถูกนำส่งเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางโดยมี lentivirus เป็นตัวพา มีการแสดงออกของยีนในระยะเวลานาน (long-term gene expression) (42) จึงมีนักวิจัยพยายามทดลองใช้ lentivirus เป็นตัวพาในการนำส่งยีนเพื่อรักษาโรคทางระบบประสาท เช่น โรคพาร์กินสันและโรคฮันติงตัน เช่น การใช้ lentivirus เป็นตัวพานำส่งยีนเพื่อศึกษาความผิดปกติของโปรตีน α -synuclein ซึ่งถ้าเกิดการกลายพันธุ์บริเวณยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนชนิดนี้ จะทำให้มีการสร้างโปรตีนผิดปกติมาสะสมบริเวณ substantia nigra ใน dopaminergic neurons ก่อให้เกิดการพัฒนาเป็นโรคพาร์กินสันได้ (43)

ตารางที่ 2.1 ไวรัสที่ใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง (44)

Vector	Virion type	Particle size	Titers (transducing units ml ⁻¹)	Transgene capacity (maximum)
MoMLV	Retrovirus (RNA)	100 nm	10 ⁶ -10 ⁹	7-8 kb
Lentivirus	Retrovirus (RNA)	100 nm	10 ⁶ -10 ⁹	7-8 kb
Recombinant adenovirus	Adenovirus (dsDNA)	80-120 nm	10 ¹⁰ -10 ¹²	20 kb
'Gutless' adenovirus	Adenovirus (dsDNA)	80-120 nm	10 ⁸	Up to 36 kb
Adeno-associated virus	Parvovirus (ssDNA)	20-30 nm	10 ⁹ -10 ¹³	4.5 kb
Sindbis	RNA (alphavirus) (ssRNA)	60-65 nm	10 ⁷	6 kb*
Poliovirus replicon	Picornavirus (ssRNA)	30 nm	10 ⁹	6 kb [†]
HSV amplicon	Herpesvirus (dsDNA)	120-300 nm	10 ⁸	Up to 150 kb
HSV recombinant virus	Herpesvirus (dsDNA)	120-300 nm	10 ¹¹	30-50 kb

ไวรัสที่ได้มีการใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนสู่ระบบประสาทส่วนกลางสรุปไว้ในตารางที่ 2.1 ข้างต้น ซึ่งแสดงชนิด ขนาดและปริมาณของไวรัส รวมทั้งขนาดของยีนที่เหมาะสมในการนำส่งได้ถูกระบุไว้ อย่างไรก็ตาม การนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางโดยใช้ไวรัสเป็นตัวพานั้นมีข้อเสียหลายประการ เช่น การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วย การเตรียมไวรัสเพื่อใช้ในการนำส่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน อีกทั้งยังมีราคาแพง

ในการเตรียมแต่ละครั้งก็ได้ปริมาณเพียงเล็กน้อย ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยจึงหันมาให้ความสนใจการใช้ตัวพาแบบไม่อาศัยไวรัสในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งนับว่ามีความปลอดภัยมากกว่าการนำส่งโดยอาศัยไวรัส ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.2.2 ตัวพาที่ใช้ในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางแบบไม่อาศัยไวรัส

2.2.2.1 พอลิเมอร์ (polymers)

นักวิจัยหลายกลุ่มได้พยายามคิดค้นและพัฒนาพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีน โดยเฉพาะการใช้พอลิเมอร์ประจุบวกที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีคุณสมบัติในการจับกับดีเอ็นเอซึ่งมีประจุเป็นลบได้เป็นอย่างดี ผ่านแรงกระทำระหว่างประจุ (electrostatic interaction) เรียกรวมการจับกันระหว่างพอลิเมอร์และดีเอ็นเอว่า “polyplex” ตัวอย่างพอลิเมอร์ประจุบวกที่ใช้ศึกษาการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ PLL และ PEI โดย PEI เป็นพอลิเมอร์ที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากมีประจุที่เป็นบวกทำให้สามารถจับกับประจุลบของดีเอ็นเอชนิดแน่นเป็นก้อนในขนาดที่เหมาะสมแก่การนำส่ง อีกทั้งยังมีคุณสมบัติช่วยปลดปล่อยดีเอ็นเอออกจากเอนโดโซมที่เรียกว่า “proton spong effect” ป้องกันการถูกทำลายของดีเอ็นเอจากเอนไซม์และสภาวะความเป็นกรดสูงภายในเอนโดโซม ทำให้มีการแสดงออกของยีนต่อไปได้ (45) ในปี ค.ศ. 2005 Wang และคณะ (46) ได้นำ PEI มาใช้เป็นตัวพานำส่งยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ nerve growth factor (NGF) ซึ่งผลจากงานวิจัยพบว่ามีสังเคราะห์ประสาทเพิ่มมากขึ้นภายหลังการนำส่งยีนเข้าไป นอกจากนี้ยังมีการใช้พอลิเมอร์ชนิดอื่น เช่น PEGylated ในการนำส่งยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ Tyrosine hydroxylase (TH) เพื่อช่วยในการรักษาผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน ซึ่งประสบความสำเร็จกับการทดลองในสัตว์ทดลองแล้ว (47)

2.2.2.2 ไขมัน (lipids)

ไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่มีประจุบวก (cationic lipids) ได้ถูกนำมาใช้ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยความเป็นประจุบวกทำให้สามารถจับแน่นกับประจุลบของดีเอ็นเอเกิดเป็น “lipoplex” อีกทั้งยังมีส่วนประกอบของไขมันทำให้สามารถผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีลักษณะเป็น phospholipid bilayer ได้ ตัวอย่าง cationic lipids ที่ใช้กันในปัจจุบัน เช่น 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) และชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine™2000 ซึ่งเป็นที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทดสอบการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทพบว่ามีประสิทธิภาพเพียง 20-25% เท่านั้น (48)

2.2.2.3 โพลีเปปไทด์/โปรตีน (polypeptides/proteins)

การใช้โพลีเปปไทด์หรือโปรตีนในการนำส่งยีนมีข้อดีคือ สามารถออกแบบตำแหน่งที่ใช้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีความจำเพาะ ทำให้เกิดการจับแน่นระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีนที่จะใช้ในการนำส่ง นอกจากนี้ยังสามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะมากขึ้นโดยการใช้แอนติบอดีหรือสายเปปไทด์ซึ่งมีความจำเพาะต่อรีเซปเตอร์บนเซลล์เป้าหมายช่วยในการนำส่งยีน ในปี ค.ศ. 2004 Ma และคณะ (49) ได้ทำการทดลองในเซลล์ประสาทหนูเพาะเลี้ยง PC-12 โดยออกแบบเปปไทด์ให้มีความจำเพาะต่อรีเซปเตอร์ของ NGF พบว่าเปปไทด์ที่ถูกนำส่งเข้าไปมีผลต่อความอยู่รอดและอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทที่เพิ่มมากขึ้นในภาวะที่ปราศจากซีรัม นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาอนุภาคผสมในการนำส่งยีนที่ใช้เปปไทด์ร่วมกับพอลิเมอร์ประจุบวก เช่น ในงานวิจัยของ Kwon และคณะ, 2010 (50) มีการพัฒนาอนุภาคผสมจากการใช้โปรตีน Tet1 ร่วมกับพอลิเมอร์ประจุบวก PEI และผสมกับ polyethylene glycol (PEG) ช่วยในการนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกของ luciferase gene เข้าสู่ neural progenitor cells (NPCs) พบว่า เมื่อใช้อนุภาคผสมที่มีโปรตีน Tet1 ในการนำส่งยีนร่วมด้วยจะมีสัญญาณ luciferase สูงกว่าการใช้ PEI ร่วมกับ PEG ซึ่งการระบบนำส่งยีนครั้งนี้ อาจจะนำไปใช้รักษาโรคทางจิตประสาทด้วยยีนบำบัดต่อไปได้ในอนาคต

2.2.2.4 อนุภาคนาโน (nanoparticle)

ปัจจุบันมีการนำความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในหลาย ๆ ด้าน รวมถึงการพัฒนากระบวนการนำส่งยีนโดยใช้อนุภาคนาโนเป็นตัวพาที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยสูง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการนำส่งโดยอาศัยไวรัสเป็นตัวพา อย่างไรก็ตามการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทด้วยอนุภาคนาโนยังมีการศึกษาอยู่ในระดับที่น้อยมาก งานวิจัยของ Errico และคณะในปี ค.ศ. 2009 (51) ได้พัฒนาอนุภาคนาโนจาก maleic anhydride และ butyl vinyl ether (VAM41) บรรจุด้วย retinoic acid (RA) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า RA จะช่วยในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ทุกชนิดรวมถึงเซลล์ประสาท โดยได้ทดลองนำอนุภาคนี้นี้มาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH ผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ประสาทเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการนำส่งด้วยอนุภาคนาโน นอกจากนี้ Molhotra และคณะ, 2011 (52) ได้สังเคราะห์ PEGylated chitosan nanoparticles เป็นตัวพาสำหรับนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง พบว่าอนุภาคนี้นี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยและมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูง มีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวพาสำหรับนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาท

2.2.2.5 ดีเอ็นเอเปลือย (naked DNA)

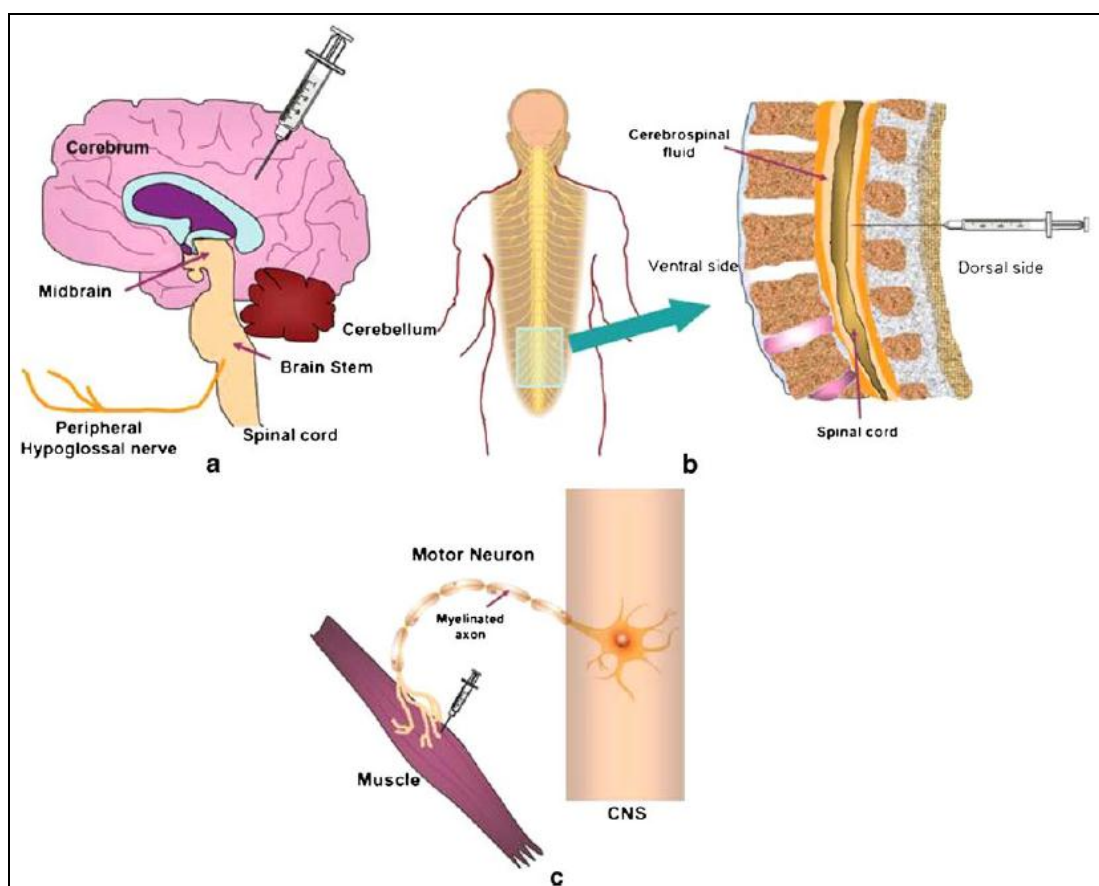
การนำส่งดีเอ็นเอเปลือยเข้าสู่เซลล์เป้าหมายส่วนใหญ่จะใช้วิธีทางกายภาพ เช่น electroporation หรือการใช้สารเคมีในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย อย่างไรก็ตามการนำส่งยีนสู่ระบบประสาทโดยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพในการนำส่งค่อนข้างต่ำ ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอมากจึงจะมีการแสดงออกของยีนได้ ยกตัวอย่างเช่น การทดลองของ Choi และคณะ, 2007 (53) พบว่า เมื่อนำส่ง naked plasmid DNA เข้าสู่เซลล์ประสาทเพื่อรักษาภาวะการบาดเจ็บของไขสันหลังจะมีการแสดงออกของยีนอยู่ในระดับต่ำ จึงควรมีการพัฒนากระบวนการนำส่งยีนโดยใช้ตัวพาชนิดต่าง ๆ เพื่อมาเสริมประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทต่อไป

ปัจจุบันมีนักวิจัยและบริษัทต่าง ๆ ได้พยายามพัฒนาอุปกรณ์และสารเคมีเพื่อใช้เป็นตัวพานำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางให้มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่ก็ยังเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก เช่น ในกรณีของบริษัท Labtech International ประเทศสหราชอาณาจักร ได้ผลิตอุปกรณ์ชื่อ MicroPorator ซึ่งอาศัยเทคโนโลยี electroporation เพื่อให้สามารถนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองกับเซลล์ประสาท SH-SY5Y พบว่า มีประสิทธิภาพเพียง 64% (54) นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับการใช้เทคนิค calcium phosphate ว่ามีประสิทธิภาพดีในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทชนิด SK-N-SH (55) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของบริษัท Clontech ประเทศสหรัฐอเมริกาที่อาศัยเทคนิคนี้ในการทดสอบ โดยได้ผลิตชุดน้ำยา CalPhos mammalian transfection ออกสู่ตลาดไปโอเทค ต่อมาเมื่อมีการศึกษาพบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง โดยการใช้น้ำยามากกว่าหนึ่งชนิดมาผสมกัน ซึ่งการนำส่งยีนด้วยน้ำยานำส่งแต่ละชนิดจะมีจุดแข็งที่ต่างกัน (56) เมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานการใช้ชุดน้ำยา FuGENE HD transfection ของ Roche Applied Science ประเทศสหรัฐอเมริกา ในการนำส่งยีนสู่เซลล์ประสาทได้ประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้น้ำชนิดอื่น คือ calcium phosphate และชุดน้ำยา L (ไม่เปิดเผยชื่อการค้าในการทดลอง) (57)

2.3 ช่องทางการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง

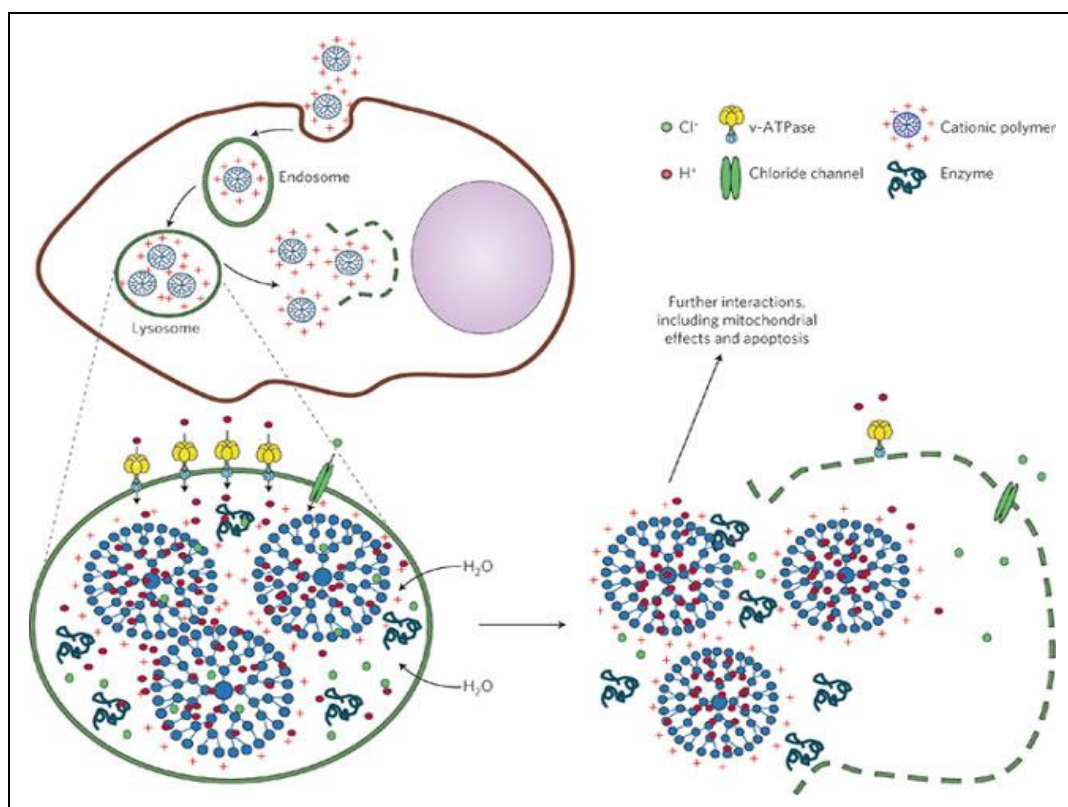
สำหรับช่องทางที่ใช้ในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีโดยตรงและวิธีโดยอ้อมดังแสดงในภาพที่ 2.2 วิธีโดยตรงคือการฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอพร้อมทั้งตัวพาผ่านกระโหลกศีรษะและเยื่อหุ้มสมองเข้าสู่สมองโดยตรง (intraparenchymal direct injection) (ภาพที่ 2.2a) ซึ่งวิธีนี้จะได้ผลดีที่สุดแต่จะทำให้ผู้ป่วยได้รับความเจ็บปวดและมีการอักเสบบริเวณที่ฉีดสารเข้าไปได้ นอกจากนี้ การฉีดสารผ่านทางไขสันหลัง (intrathecal injection) (ภาพที่ 2.2b) ก็เป็นวิธีที่ใช้ได้ผลอีกวิธีหนึ่ง ผู้ป่วยจะได้รับความเจ็บปวดน้อยกว่าการฉีดเข้าสู่

สมองโดยตรง วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลาย เช่น ในงานวิจัยของ Wang และคณะ, 2005 (46) ได้ทดลองนำส่งยีนผ่านทางไขสันหลังบริเวณ lumbar เพื่อฟื้นฟูเซลล์ประสาทในหนูประสบความสำเร็จ สำหรับวิธีโดยอ้อมในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทคือการฉีดสารผ่านทางหลอดเลือด (intravenous injection) และกล้ามเนื้อ (intramuscular injection) (ภาพที่ 2.2c) แต่วิธีนี้ยังได้ผลไม่ดีนัก เนื่องจากยีนที่ถูกนำส่งเข้าไปไม่สามารถผ่านเข้าไปยังระบบประสาทได้



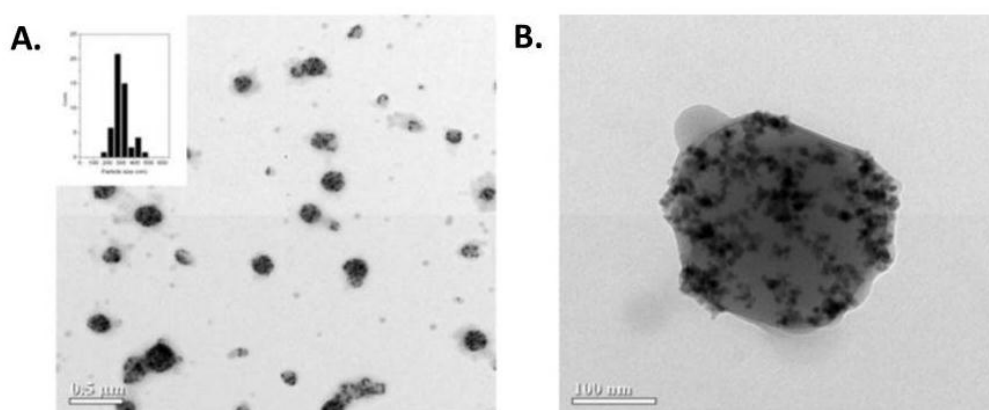
ภาพที่ 2.2 บริเวณต่างๆ ที่ใช้เป็นช่องทางในการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาท
a. Intraparenchymal direct injection, b. Intrathecal injection และ c. Intramuscular injection (58)

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยมุ่งพัฒนาระบบนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวกเป็นตัวพา ในกระบวนการสังเคราะห์นั้นได้เลือกใช้พอลิเมอร์ประจุบวกคือ PEI เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงและมีคุณสมบัติเฉพาะที่เรียกว่า “proton sponge effect” (ภาพที่ 2.3) ช่วยป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์และสภาวะความเป็นกรดสูงภายในเอนโดโซม (59) ทั้งนี้ PEI เป็นพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอมีน (NH_3) เป็นส่วนประกอบทำให้มีความเป็นประจุบวกสูงและมีความเป็นเบสอ่อนจึงสามารถรับโปรตอน (H^+) ได้มาก นอกจากนี้ ยังมีการดึงคลอไรด์ไอออน (Cl^-) และน้ำเข้าสู่เอนโดโซม ทำให้มีการสะสมของ Cl^- และมีแรงดันออสโมติกเพิ่มมากขึ้นจึงเกิดการบวมแตกของเอนโดโซม polyplex จึงถูกปลดปล่อยออกจากเอนโดโซมรอดพ้นจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ ซึ่งในงานวิจัยได้ทำการพัฒนานำอนุภาคแม่เหล็กนาโนมาใช้เป็นตัวพานำส่งยีนร่วมกับ PEI ทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเพิ่มสูงขึ้นภายใต้การเหนี่ยวนำจากแรงแม่เหล็ก (magnetofection)



ภาพที่ 2.3 การเกิด proton sponge effect (60)

อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สังเคราะห์โดย Pimpha และคณะ, 2012 (4) ด้วยวิธี emulsion polymerization ซึ่งมี poly(methyl methacrylate) (PMMA) เป็นแกนกลางของอนุภาคหุ้มด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก polyethyleneimine (PEI) และมีสารเหล็ก iron oxide (IO) กระจายอยู่ภายในอนุภาค ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนถูกกระตุ้นโดย *t*-butyl hydroperoxide (TBHP) เป็น initiator พบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นมีส่วนประกอบเป็นสารแม่เหล็กกระจายตัวอยู่ภายในโมเลกุลของอนุภาคเป็นจำนวนมาก มีรูปร่างกลมและขนาดของอนุภาคกระจายตัวอยู่ในช่วง 100-200 นาโนเมตร จากการตรวจสอบโดยใช้ transmission electron microscope (TEM)



ภาพที่ 2.4 mag-PEI NP จากการตรวจสอบโดยใช้ TEM ภาพ A คือ mag-PEI NP และฮิสโตแกรมแสดงการกระจายตัวของค่าที่ได้จากการวัดขนาดของอนุภาคและภาพ B คือ mag-PEI NP ที่มีสารแม่เหล็กเป็นองค์ประกอบอยู่ภายในอนุภาคเป็นจำนวนมาก

2.4 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอกับพอลิเมอร์ประจุบวก (DNA packaging)

การจับกันของดีเอ็นเอและพอลิเมอร์แบ่งออกเป็น 3 แบบ (ภาพที่ 2.5) ดังนี้

2.4.1 Electrostatic interaction

การจับกันระหว่างพอลิเมอร์กับดีเอ็นเอรูปแบบนี้อาศัยความเป็นประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอจับกับประจุบวกของพอลิเมอร์ เนื่องจากพอลิเมอร์ที่ใช้ส่วนใหญ่มีหมู่เอมีน (NH_3) เป็นส่วนประกอบ ก่อให้เกิดการเกาะกลุ่มผ่านแรงกระทำระหว่างประจุ (electrostatic interaction) ซึ่งสามารถเกิดแรงกระทำต่อกันได้เองเมื่อมีอัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสเฟตที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม ความเป็นประจุบวกของอนุภาคโดยเฉพาะอนุภาคที่มีความเป็นประจุบวกค่อนข้างสูงอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์บางชนิดนอกจากนี้ ยังทำให้การปลดปล่อยดีเอ็นเอออกจากอนุภาคเพื่อเข้าไปยังเซลล์เป้าหมายเกิดขึ้นได้ยาก นักวิจัยจึงมีความพยายามพัฒนาการใช้รูปแบบ

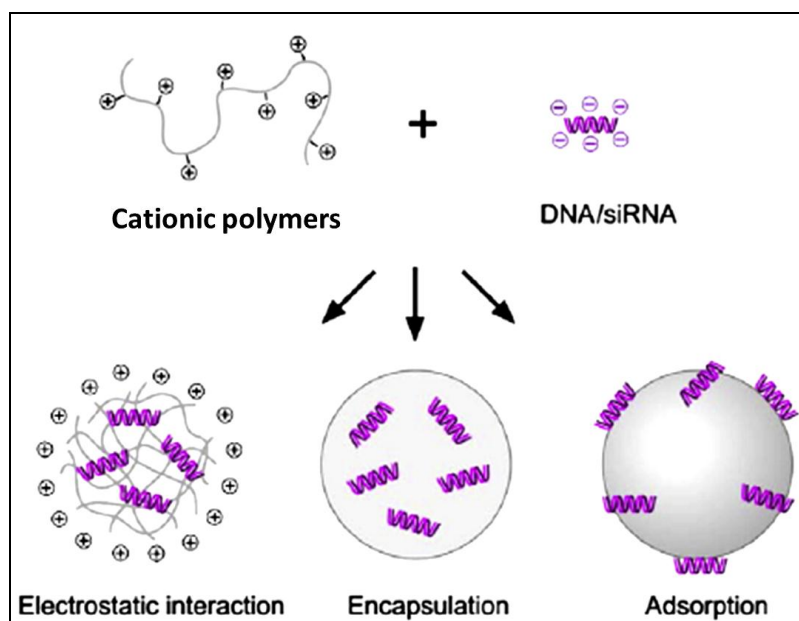
อื่นในการจับกันระหว่างดีเอ็นเอและพอลิเมอร์ประจุบวก ได้แก่ รูปแบบ encapsulation และ adsorption

2.4.2 Encapsulation

รูปแบบนี้จะใช้พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ง่าย เช่น polyester ห่อหุ้มดีเอ็นเอที่ต้องการจะนำส่ง เมื่อ polyplex เคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์พันธะเอสเทอร์ในพอลิเมอร์จะถูกทำลายย่อยสลายกลายเป็นสายโพลิโกเมอร์ชิ้นสั้น ๆ และถูกกำจัดออกจากร่างกาย ทำให้มีการปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ อย่างไรก็ตามขั้นตอนการห่อหุ้มต้องใช้สารเคมี แรงดันสูง หรืออุณหภูมิสูง ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายได้ นอกจากนี้ ยังมีปัญหาเกี่ยวกับการปล่อยดีเอ็นเอออกมาอย่างไม่สมบูรณ์อีกด้วย

2.4.3 Adsorption

ตัวพารูปแบบนี้จะอาศัยความเป็นประจุบวกที่ผิวของอนุภาคเพื่อให้ประจุลบของดีเอ็นเอมาจับได้และเมื่อพอลิเมอร์ถูกทำลายหรือความเป็นประจุบวกลดลงเมื่อเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ทำให้มีการแยกจากกันระหว่างพอลิเมอร์และดีเอ็นเอ ก็จะสามารถปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ ข้อเสียของวิธีนี้คือ ไม่สามารถปกป้องดีเอ็นเอจากการย่อยสลายได้ เมื่อเทียบกับ 2 วิธีข้างต้น ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่จับกับดีเอ็นเอในรูปแบบนี้ ได้แก่ PEI, poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA)



ภาพที่ 2.5 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอกับพอลิเมอร์ประจุบวกแบบ electrostatic interaction, encapsulation และ adsorption (61)

2.5 กลไกการเข้าเซลล์ (endocytosis)

กลไกการเข้าเซลล์ของตัวพาแบบไม่อาศัยไวรัสส่วนใหญ่จะอาศัยกระบวนการเอนโดไซโตซิสในการนำโมเลกุลเข้าสู่เซลล์ สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ การเข้าเซลล์แบบจำเพาะ (targeting uptake) และการเข้าเซลล์แบบไม่จำเพาะ (non-specific uptake) ดังภาพ 2.6 มีรายละเอียดดังนี้

2.5.1 การเข้าเซลล์แบบจำเพาะ (targeting uptake)

2.5.1.1 Phagocytosis เป็นกระบวนการนำสารโมเลกุลขนาดใหญ่มากกว่า 0.5 ไมโครเมตรเข้าสู่เซลล์ โดยจะเกิดกับเซลล์ที่จำเพาะเท่านั้น เช่น neutrophils และ macrophages ที่ต้องอาศัยกระบวนการฟาโกไซโตซิสในการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกาย อย่างไรก็ตามการนำส่งยีนเข้าเซลล์โดยอาศัยกระบวนการฟาโกไซโตซิสเกิดขึ้นน้อยมาก แต่ก็มีการศึกษาพบว่า lipoplex หรือ polyplex ขนาดใหญ่ สามารถผ่านเข้าเซลล์โดยอาศัยกระบวนการฟาโกไซโตซิสได้เช่นกัน (62)

2.5.1.2 Pinocytosis เป็นกระบวนการนำสารเข้าสู่เซลล์ที่สามารถเกิดขึ้นได้กับเซลล์ทุกชนิด สามารถจำแนกได้ 4 ประเภท ดังนี้

(1) Macropinocytosis การนำสารเข้าเซลล์โดยกระบวนการนี้จะอาศัยการทำงานของแอกติน (actin) การกระตุ้นจาก growth factor และการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ทำให้เกิดส่วนที่มีลักษณะคล้ายแขน (ruffling) โอบล้อมโมเลกุลให้เข้าสู่เซลล์ เกิดเป็น macropinosomes ขนาดใหญ่ได้สูงสุดถึง 5 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นข้อดีที่ช่วยทำให้สามารถนำสารขนาดใหญ่ผ่านเข้าสู่เซลล์โดยไม่ต้องถูกทำลายจากเอนไซม์ภายในเอนโดโซม เนื่องจาก macropinosomes มีสถานะที่เป็นกรดน้อยกว่าในไลโซโซมและมีผนังที่บางทำให้โมเลกุลถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่าย เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีรายงานพบว่า TAT peptide ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยเสริมประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสามารถเข้าสู่เซลล์ผ่านทางกระบวนการนี้ได้เช่นกัน (63)

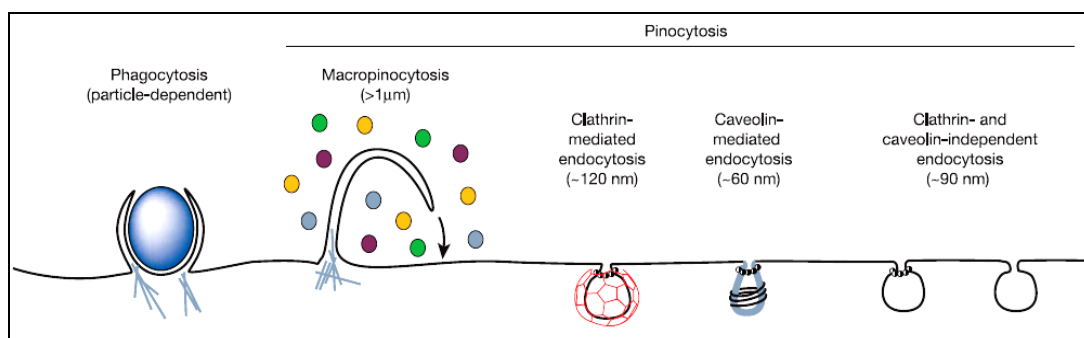
(2) Clathrin-mediated endocytosis (CME) เป็นกระบวนการหลักในการนำสารเข้าเซลล์ผ่านทางกระบวนการเอนโดไซโตซิส การทำงานจะอาศัยการจับกันระหว่างลิแกนด์และตัวรับที่จำเพาะบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการฟอร์มตัวของ clathrin-coated pit ลักษณะคล้ายโครงร่างตาข่ายเว้าเข้าไปในเซลล์โดยหุ้มเอาโมเลกุลที่จับกับตัวรับอย่างจำเพาะเข้าไปด้วยเกิดเป็น clathrin-coated vesicles (CCVs) จากนั้นจะเกิดการหลอมรวมกับเอนโดโซมและปลดปล่อยอนุภาคเข้าสู่ไซโตพลาสซึมต่อไป ถึงแม้ว่าการเข้าเซลล์โดยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีแต่เอนไซม์และสถานะที่เป็นกรดภายในไลโซโซมก็อาจจะทำลายสารที่ถูกนำส่งเข้าไปได้ อย่างไรก็ตาม PEI ซึ่งเป็น

พอลิเมอร์ประจุบวกก็มีคุณสมบัติพิเศษช่วยในการปลดปล่อยอนุภาคออกจากไลโซโซมได้อย่างรวดเร็วก่อนที่จะถูกทำลายดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

(3) Caveolae-mediated endocytosis เป็นกระบวนการนำสารเข้าเซลล์โดยอาศัย caveolae ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีลักษณะเว้าคล้าย flask shape พบมากในเซลล์ทุกชนิดโดยเฉพาะ endothelial cells เมื่อสารเข้าเซลล์ผ่านทาง caveolae จะมีการหุ้มโมเลกุลไว้เกิดเป็นถุงหุ้มเรียกว่า caveosomes และนำสารผ่านเข้าสู่ออร์แกเนลล์อื่นต่อไป เช่น golgi apparatus และ endoplasmic reticulum โดยไม่ต้องผ่านการห่อหุ้มเชื่อมรวมกับเอนโดโซม ทำให้รอดพ้นจากการทำลายโดยเอนไซม์และสภาวะความเป็นกรดภายในเอนโดโซม

(4) Clathrin- and caveolin- independent endocytosis การเข้าเซลล์โดยอาศัยกระบวนการนี้กลไกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จะเกิดขึ้นมากบริเวณเซลล์ประสาทและ neuroendocrine cells

2.5.1.3 Receptor-mediated endocytosis เป็นกระบวนการเข้าเซลล์ที่เกิดขึ้นโดยสารที่จะนำส่งต้องมีความจำเพาะในการจับกับโปรตีนตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์จึงจะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ หลังจากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จึงจะเว้าเข้าไปเกิดเป็นถุงหุ้มและหลุดเข้าไปภายในเซลล์



ภาพที่ 2.6 กลไกการเข้าเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ (64)

2.5.2 การเข้าเซลล์แบบไม่จำเพาะ (Non-specific uptake)

2.5.2.1 Ionic interaction with membrane-bound proteoglycans and endocytosis

การเข้าเซลล์โดยกระบวนการนี้อาศัยแรงปฏิกริยาระหว่างตัวพาที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกทำปฏิกริยากับโปรตีน carboxylated glycosaminoglycans (GAGs) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ proteoglycans บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนนี้มีความเป็นประจุลบสูงเมื่อแรงระหว่างประจุของโมเลกุลทำปฏิกริยากับตัวพาประจุบวก จึงทำให้สามารถนำสารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ได้ ถึงแม้การ

เข้าเซลล์โดยกลไกนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่ก็เป็นประโยชน์ในการนำส่งยีน โดยใช้ตัวพากลุ่มพอลิเมอร์ที่มีความเป็นประจุบวกสูง เช่น PEI

2.5.2.2 Lipophilic interaction with phospholipid membrane and endocytosis

กระบวนการเข้าเซลล์โดยอาศัยตัวพาที่เป็นลิพิด ทำให้สามารถผ่านชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีลักษณะเป็น phospholipid bilayer ได้

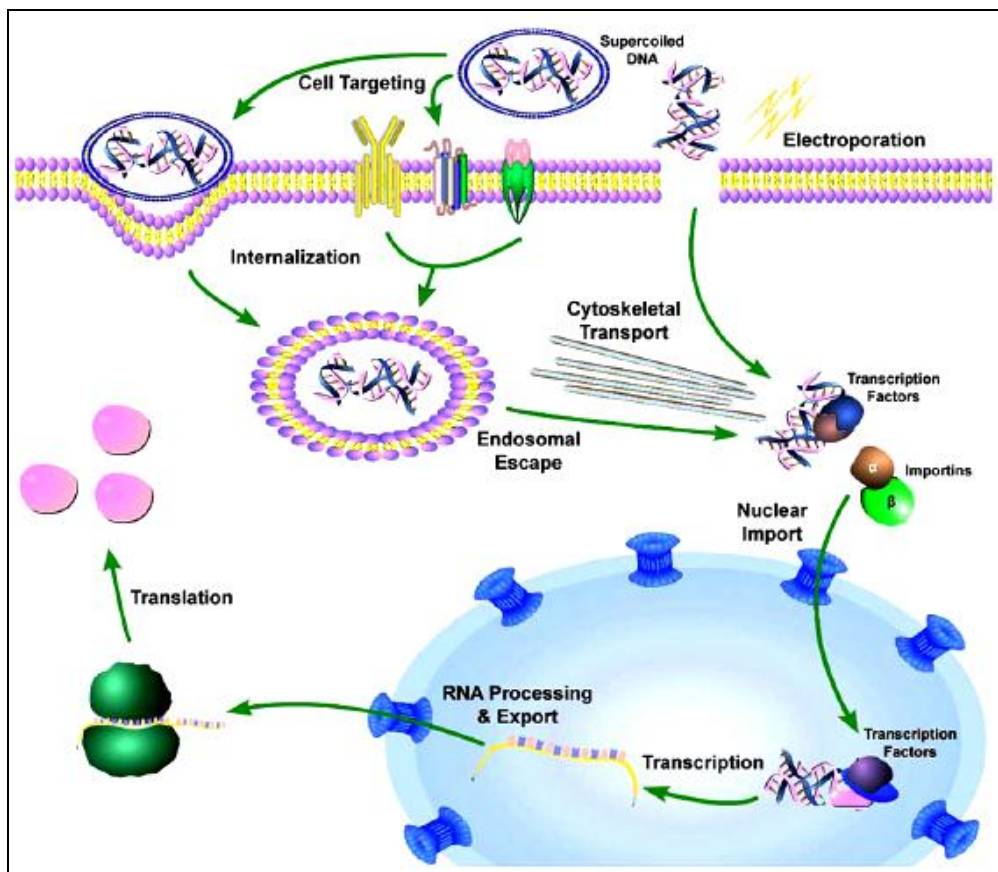
2.5.2.3 Cell penetrating peptide-mediated uptake

กระบวนการนำสารเข้าเซลล์โดยวิธีนี้อาจจะเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ ทั้งการผ่านเข้าสู่เซลล์โดยตรง การเข้าเซลล์โดยอาศัยการจับกันระหว่างประจุบวกของสายเปปไทด์กับประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์หรือการเข้าเซลล์โดยอาศัยวิธีเอนโดไซโตซิส ซึ่งสามารถจัดอยู่ในรูปแบบการเข้าเซลล์แบบจำเพาะได้เช่นเดียวกัน

2.6 การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์โดยตัวพาประจุบวก

การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์โดยตัวพาประจุบวก เช่น พอลิเมอร์ หรือไขมัน เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากจากตัวพาประจุบวกเหล่านี้สามารถจับกับประจุลบของดีเอ็นเอ ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอทั้งก้อนหดแน่นอยู่ในขนาดเหมาะสมสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ หากเป็นตัวพาประเภทพอลิเมอร์จับกับดีเอ็นเอเกิดเป็นอนุภาค เรียกว่า “polyplex” ตัวพาเป็นไขมันประจุบวก เรียกว่า “lipoplex” หรือหากพอลิเมอร์มีส่วนผสมของสารเหล็กอยู่ภายในโมเลกุลจะเรียกว่า “magnetoplex” การมีประจุบวกของตัวพาเหล่านี้มีข้อดีคือเพิ่มแรงดึงดูดในการเกาะติดกับสารประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น proteoglycans และสามารถเข้าผ่านเข้าสู่เซลล์ได้โดยกระบวนการเอนโดไซโตซิสหรืออาศัยวิธี electroporation ซึ่งเป็นการนำส่งยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรู จากนั้นจะมีการสร้างถุงเอนโดโซมมาห่อหุ้มสารที่นำส่งเข้าไป ในขั้นตอนนี้สารพันธุกรรมอาจถูกทำลายจากเอนไซม์และสภาวะความเป็นกรดสูงภายในเอนโดโซมได้ แต่หากพอลิเมอร์มีส่วนผสมของ PEI ดังเช่นพอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้จะสามารถเกิด proton sponge effect ดังหลักการที่ได้กล่าวไปข้างต้น ทำให้ polyplex ถูกปลดปล่อยออกจากเอนโดโซมก่อนถูกทำลาย จากนั้น polyplex จะเข้าสู่เซลล์และแยกตัวออกจากดีเอ็นเอได้เมื่อแรงกระทำระหว่างประจุลดต่ำลง เนื่องจากองค์ประกอบภายในเซลล์ที่มีความเป็นประจุลบมากกว่า เช่น mRNA, heparin, proteoglycans ขั้นตอนนี้อาจเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึมหรือนิวเคลียสก็ได้ (ภาพที่ 2.7) จากนั้นโปรตีน transcription factor ต่าง ๆ จะเข้ามาจับกับดีเอ็นเอแล้วถูกขนส่งเข้าสู่นิวเคลียสโดยอาศัยกระบวนการ cytoskeleton transports ด้วยการทำงานของโปรตีน dynein ร่วมกับโปรตีน importins ในไซโตพลาสซึม มีการทดลองพบว่า พอลิเมอร์ประจุบวก เช่น PEI สามารถขนส่งสาร

เข้าสู่นิวเคลียสได้โดยวิธีนี้ (65) และมีการทดลองนำส่งพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีน GFP และเติมแอนติบอดีเพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน dynein ลงไป พบว่าทำให้การแสดงออกของยีนลดลง ทำให้สามารถยับยั้งบทบาทของโปรตีน dynein ในการขนส่งสารได้ (66) เมื่อ polyplex เคลื่อนที่ของไปยังนิวเคลียสแล้วจะสามารถเข้าสู่นิวเคลียสได้ผ่านทาง nucleopore ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายอย่างเช่น ขนาดและรูปร่างของอนุภาค หรือความจำเพาะต่อตัวรับบนเยื่อหุ้มนิวเคลียส เพื่อลดอุปสรรคในขั้นนี้จึงมีการคิดค้นวิธีนำส่งสารให้ประสบผลสำเร็จดีขึ้นโดยเติม nuclear localization sequence ซึ่งเป็นเปปไทด์ประจุบวกสายสั้นเข้าไปยังพลาสมิดที่ต้องการจะนำส่ง เปปไทด์นี้สามารถจับกับ polyplex หรือดีเอ็นเอได้ผ่านแรงกระทำระหว่างประจุเพื่อให้สามารถส่งสัญญาณผ่าน nuclear localization signal (NLS) และเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ได้ ในปี ค.ศ. 2005 Mesika และคณะ ได้ทำการทดลองเติม nuclear localization sequence ในการนำส่งยีน พบว่าประสิทธิภาพในการนำส่งยีนผ่านเข้าสู่นิวเคลียสดีขึ้น (67) เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสแล้วจะเกิดกระบวนการ transcription และ translation สังเคราะห์ออกมาเป็นโปรตีนได้ต่อไป



ภาพที่ 2.7 กลไกการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์โดยพอลิเมอร์ประจุบวก (68)

2.7 Cell penetrating peptides (CPPs) และ Trans-activating transcriptional peptide (TAT peptide)

การพัฒนากระบวนการนำส่งยีนให้มีประสิทธิภาพสูงเป็นเรื่องที่มีการศึกษาวิจัยและพัฒนากันมาอย่างต่อเนื่อง ระบบนำส่งที่ได้รับความสนใจใช้อย่างแพร่หลายอีกอย่างหนึ่งก็คือการใช้โปรตีนช่วยในการนำส่งยีน โปรตีนในกลุ่ม CPPs เป็นสายเปปไทด์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 5-60 ตัว มีความสามารถในการแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และนำส่งชิ้นส่วนเข้าสู่ไซโตพลาสซึมหรือนิวเคลียสของเซลล์เป้าหมายได้ (69) จึงมีการพัฒนานำ CPPs มาใช้ในระบบนำส่งยีนเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. Protein-derived peptides เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่มีส่วนประกอบของโดเมนที่ช่วยในการนำส่งยีน เรียกว่า Protein Transduction Domains (PTDs) ยกตัวอย่างเปปไทด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ TAT peptide ซึ่งเป็นโปรตีนของเชื้อไวรัส HIV (human immunodeficiency virus) (70) , penetratin จากโปรตีนของ Drosophila Antennapedia (71) และ pVEC จากโปรตีนในหนู (72)

2. Model peptides เป็น CCPs ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ CCPs เดิมที่รู้จักคุณสมบัติอยู่แล้ว ยกตัวอย่างเช่น model amphipathic peptide (MAP) (73)

3. Designed peptides เป็นสายเปปไทด์ที่ได้รับการออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นใหม่จากการนำส่วน hydrophilic และ hydrophobic ของสายเปปไทด์สองชนิดมาหลอมรวมกัน ยกตัวอย่างเช่น MPG ที่ได้จากการผสมสายเปปไทด์ระหว่าง HIV-1 gp41 และ SV40 T-antigen (74)

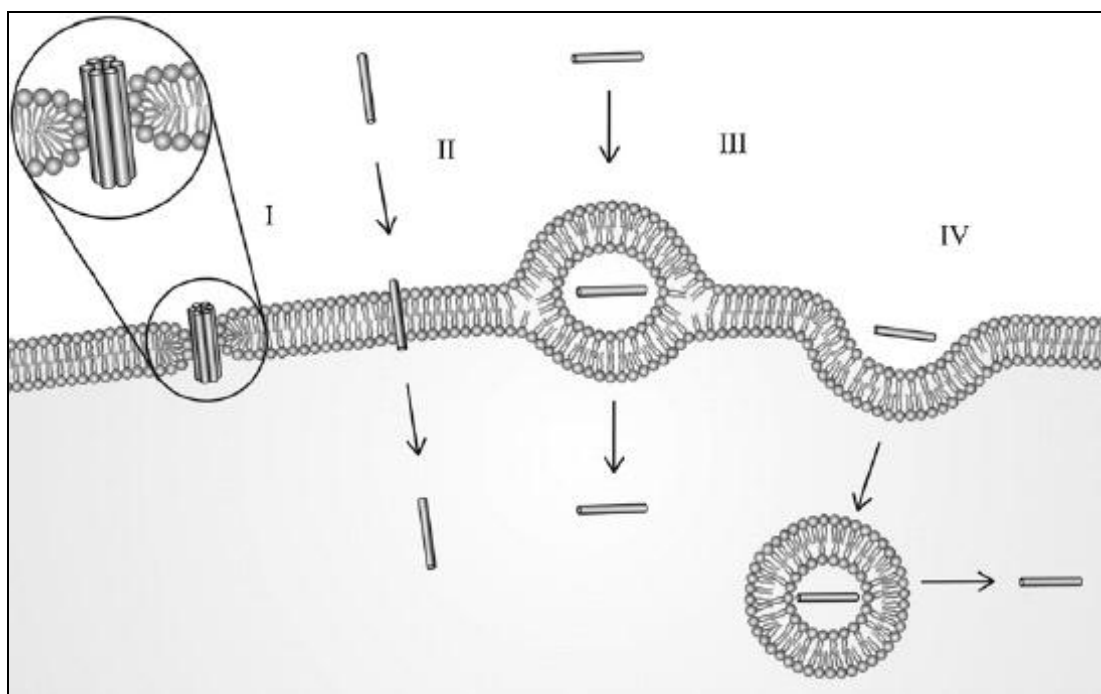
CPPs เป็นสายเปปไทด์ที่มีประจุรวมเป็นบวก เนื่องจากส่วนใหญ่มีกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีนเป็นองค์ประกอบ โดย TAT peptide เป็น CPPs ที่มีการศึกษาและนิยมใช้มากที่สุด ได้รับการสังเคราะห์ขึ้นจาก trans-activating transcriptional protein ของเชื้อ HIV-1 มีลำดับกรดอะมิโนพื้นฐานคือ YGRKKRRQRRR (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนซ้ำกัน 6 ตำแหน่งและไลซีน 2 ตำแหน่ง ทำให้มีประจุรวมเป็นบวกสามารถจับกับประจุลบของดีเอ็นเอได้ดีและมีการศึกษาทดลองพบว่าการใช้ TAT peptide จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความรวดเร็วในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้น (75, 76) ซึ่งมีสมมติฐานคาดว่ากลไกที่โปรตีนในกลุ่ม CPPs ใช้ในการเข้าเซลล์สามารถเป็นไปได้ 4 กระบวนการ (ภาพที่ 2.8) ดังนี้

1. Formation of peptide lined pores within the membrane กลไกนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จะอาศัยการเรียงตัวของเปปไทด์เป็นกลุ่มแทรกผ่านรูของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงสามารถนำสารผ่านเข้าเซลล์ได้

2. Direct penetration กระบวนการนำส่งสารผ่านกลไกนี้จะอาศัยการจับกันผ่านแรงกระทำระหว่างประจุ ประจุบวกในสายเปปไทด์จะจับกับประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สายเปปไทด์รวมกับผิวเยื่อหุ้มเซลล์และสามารถนำส่งสารเข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่ต้องอาศัยพลังงาน

3. Formation of inverted micelles กลไกการเข้าเซลล์รูปแบบนี้อาศัยโครงสร้างเปปไทด์ซึ่งมีความเป็นประจุบวกจับกับประจุลบบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์เซลล์ จากนั้นจะเกิดการกลับหัวของไมเซลล์ (inverted micelle) โดยหันเอาด้านที่ชอบน้ำเข้าหากันและหันด้านที่ไม่ชอบน้ำออกด้านนอก ทำให้เปปไทด์ที่จับอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์หลุดเข้ามาอยู่ระหว่างส่วนที่ชอบน้ำและเข้าสู่ภายในเซลล์ได้

4. Endocytosis mediated translocation กลไกนี้เป็นวิธีแบบอาศัยพลังงาน โดยจะเกิดการกินของเซลล์ แล้วส่งผ่านโมเลกุลทางเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น TAT peptide จากเชื้อไวรัส HIV ให้ผลในการขนส่งสารผ่านเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้หลายชนิด (77)

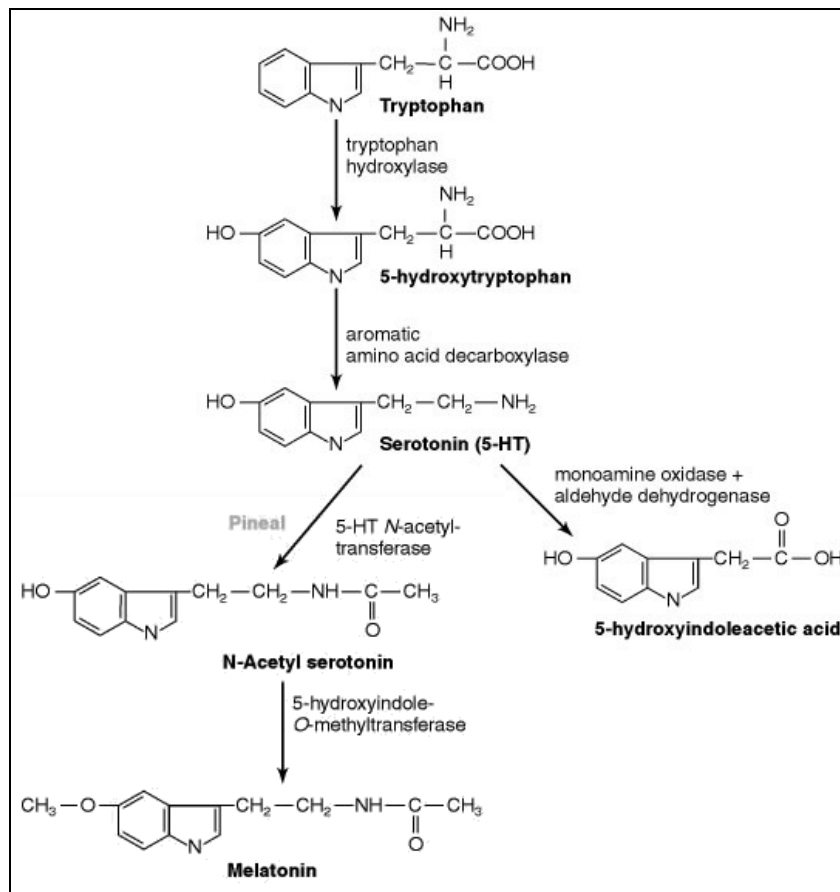


ภาพที่ 2.8 กลไกการเข้าสู่เซลล์ของ CPPs, formation of peptide lined pores within the membrane (I), direct penetration (II), formation of inverted micelles (III), endocytosis mediated translocation (IV) (78)

2.8 Tryptophan hydroxylase (TPH)

TPH เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารสื่อประสาทซีโรโทนินจากกรดอะมิโนทริปโตเฟน เริ่มจากการที่ทริปโตเฟนที่ได้รับจากการรับประทานอาหารจะถูกขนส่งเข้าสู่สมองโดยอาศัยโปรตีนตัวพาที่จำเพาะและถูกเปลี่ยนเป็น 5-hydroxytryptophan (5-HTP) โดยการทำงานของเอนไซม์ TPH ซึ่งในขั้นตอนนี้จัดเป็นขั้นกำหนดอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (rate-limiting step) ในการสังเคราะห์ซีโรโทนิน จากนั้นเอนไซม์ aromatic aminoacid decarboxylase (AADC) จะเปลี่ยน 5-HTP เป็นซีโรโทนิน และถูกส่งไปเก็บสะสมไว้ยังเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณ enterochromaffin cells ในระบบทางเดินอาหาร ส่วนที่เหลือจะถูกส่งไปเก็บไว้ที่เซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางและเกล็ดเลือด ซีโรโทนินบางส่วนอาจถูกสลายจากกระบวนการแคตาบอลิซึมภายในร่างกาย ด้วยการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) และ aldehyde dehydrogenase ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) (ภาพที่ 2.9)

เอนไซม์ TPH สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทได้แก่ เอนไซม์ TPH-1 จะทำหน้าที่สังเคราะห์ซีโรโทนินใน peripheral tissue เช่น บริเวณ enterochromaffin cells ในระบบทางเดินอาหารแต่สำหรับเอนไซม์ TPH-2 จะเป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ซีโรโทนินในระบบประสาทส่วนกลาง (79) ในภาวะที่ร่างกายขาดทริปโตเฟนความผิดปกติที่พบได้ง่ายและบ่อยที่สุดคือการเกิดความเครียดและอารมณ์แปรปรวน ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของสารสื่อประสาทซีโรโทนิน (serotonergic mechanisms) หากในภาวะที่ร่างกายขาดทริปโตเฟนจะทำให้การสังเคราะห์ซีโรโทนินไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นได้น้อย มีรายงานการตรวจระดับซีโรโทนินในผู้ป่วยโรคเครียด พบว่า มีระดับต่ำกว่าในคนปกติที่มีสุขภาพดีและในผู้ป่วยกลุ่มนี้พบว่ามีความโน้มในการเกิดโรคซึมเศร้าและเกิดการฆ่าตัวตายต่อไปได้ในที่สุด (80) นอกจากนี้ ยังพบว่าหากยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ TPH-2 เกิดการกลายพันธุ์หรือเกิดความผิดปกติแบบ single-nucleotide polymorphisms (SNPs) จะส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์ซีโรโทนินเกิดความผิดปกติ ทำให้เกิดโรคจิตประสาทได้ เช่น การเกิด depression (81, 82) bipolar disorder (83, 84) และอาจนำไปสู่พฤติกรรมเสี่ยงต่อการฆ่าตัวตายได้ในที่สุด (85)



ภาพที่ 2.9 กระบวนการสังเคราะห์และสลายซีโรโทนิน (86)

ทั้งนี้ในงานวิจัยได้นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวก PMMA/PEI core-shell magnetic nanoparticles (mag-PEI NP) ที่ได้พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ ประเมินประสิทธิภาพพร้อมทั้งความเป็นพิษต่อเซลล์ภายหลังจากการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 สภาวะการทดลองที่เหมาะสมจะถูกเลือกมาใช้ทดสอบการนำส่งยีน TPH-2 ซึ่งมีความสำคัญต่อการผลิตสารสื่อประสาทซีโรโทนินในระบบประสาทส่วนกลาง อีกทั้งยังได้ทดสอบการเสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีนโดยใช้ mag-PEI NP ร่วมกับ TAT peptide เพื่อช่วยให้การเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์เกิดขึ้นได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยมีความมุ่งหวังในการพัฒนาระบบนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาโดยใช้อนุภาคนาโนนำส่งยีนเป้าหมายเพื่อพัฒนางานวิจัยในขั้นพื้นฐานสำหรับต่อยอดงานวิจัยในการรักษาโรคโดยใช้ยีนบำบัดในผู้ป่วยโรคจิตประสาทได้ต่อไปในอนาคต

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. เครื่องวัดแสง luminescence (luminometer) รุ่น VICTOR™3	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc.	สหรัฐอเมริกา
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Inc	สหรัฐอเมริกา
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus	ญี่ปุ่น
5. กล้อง confocal laser scanning microscope (LSM-700)	Carl zeiss	เยอรมัน
6. เครื่อง thermal cycler รุ่น DNA Engine PTC-200	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
7. เครื่อง thermal cycler รุ่น PTC-200	MJ Research, Inc.	สหรัฐอเมริกา
8. เครื่อง thermal cycler รุ่น Mastercycler EP	Eppendorf AG	เยอรมนี
9. ชุดถ่ายภาพเจล (Transilluminator และ Doc-Print)	VILBER LOURMAT	ฝรั่งเศส
10. เครื่องถ่ายภาพเจล Gel Documentation systems (Gel Doc)	Syngene	สหราชอาณาจักร
11. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific Co.,Ltd	เกาหลีใต้
12. เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น FINE VORTEX	FINEPCR	เกาหลีใต้

13. เครื่อง vacuum concentrator (DNA speedVacs) รุ่น DNA110-230	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
14. เครื่อง cryocentrifuge รุ่น Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Products	เยอรมนี
15. เครื่องทิ้งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOLEDO	สวิสเซอร์แลนด์
16. ตู้อบ (incubator shaker) Minitron	Appropriate Technical Resources, Inc.	สหรัฐอเมริกา
17. ตู้อบเพาะเลี้ยง CO ₂ (CO ₂ incubator)	Sheldon Manufacturing Inc	สหรัฐอเมริกา
18. ตู้อบ (incubator)	Memmert	เยอรมนี
19. ตู้ปลอดเชื้อ (class II biosafety cabinet) รุ่น NapFLOW (Napco)	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
20. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet)	E.S.I. FLUFRANCE	ฝรั่งเศส
21. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)	Memmert	เยอรมนี
22. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Top Open Chest Freezer)	SANYO Electric Co.,Ltd	ญี่ปุ่น
23. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (ULT Deep Freezer) รุ่น DF8524	ilShin Lab Co.,Ltd.	เกาหลีใต้
24. ถัง liquid nitrogen รุ่น XT20	TAYLOR-WHARTON	สหรัฐอเมริกา
25. เครื่อง electroporator รุ่น EC100	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
26. เครื่อง Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, Ltd.	สหราชอาณาจักร
27. กล้อง Atomic force microscopy (SPA4000)	Seiko Instruments, Inc.	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. Auto pipette (ขนาด 20, 200, 1000 ไมโครลิตร)	GILSON	ฝรั่งเศส
2. Auto pipette (ขนาด 10, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร)	Eppendorf AG	เยอรมนี
3. Pipette aid รุ่น Portable XP	Drummond Scientific	สหรัฐอเมริกา
4. Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 ไมโครลิตร)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
5. Barriertips (ขนาด 10, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร)	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา
6. Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร) และ PCR tube	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
7. Centrifuge tube (ขนาด 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร)	Corning, Inc.	สหรัฐอเมริกา
8. SUB CELL รุ่น Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
9. SUB CELL รุ่น Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
10. เครื่อง power supply รุ่น POWER PAC 200 และ 300	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
11. เครื่อง power supply รุ่น SX250 MightySlim PSU.	Hoefer, Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. Luminometer plate	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
13. 96-well cell culture cluster, flat bottom with lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
14. 6-well cell culture cluster, flat bottom with lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
15. Cell culture dish (ขนาด 100 มิลลิเมตร × 20 มิลลิเมตร)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
16. Cell culture flask (ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร และ 75 ตารางเซนติเมตร)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา

17. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dishes)	Bibby Sterilin Ltd.	สหราชอาณาจักร
18. Disposable serological pipette (ขนาด 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร และ 25 มิลลิลิตร)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
19. Pasteur pipette	COPAN innovation	สหรัฐอเมริกา
20. MagnetoFACTOR-96 plate	Chemicell GmbH	เยอรมนี

สารเคมี

	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. BACTO-AGAR	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
2. Tryptone Peptone	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
3. Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
4. Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
5. 5-Bromo-4-chloro-Indoly-β-D-Galactoside (X-gal)	Bio basic, Inc.	แคนาดา
6. Isopropyl-β-D-thiogalactoside(galactopyranoside) (IPTG Dioxane Free)	US Biological	สหรัฐอเมริกา
7. ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
8. NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel	เยอรมนี
9. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอจากเจล Freeze 'N Squeeze Spin Columns	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
10. Ribonuclease A	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
11. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) powder low glucose with 4.00 mM/L Glutamine, 1000 mg/L Glucose and 110 mg/L Sodium Pyruvate	Gibco	สหรัฐอเมริกา
12. Fetal bovine serum (FBS)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา

13. HyQ trypsin 0.25 % with EDTA with 2.5 g porcine trypsin without calcium, magnesium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
14. Phosphate buffered saline	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
15. 100x Antibiotic-Antimycotic solution 10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin Amphotericin B 250 µg/ml	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
16. Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT)	Bio Basic Inc.	แคนาดา
17. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	MERCK	เยอรมนี
18. Dimethyl sulfoxide (DMSO), for molecular biology	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
19. TRIzol® RNA Isolation Reagents	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
20. Chloroform	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
21. 2-propanol	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
22. Absolute ethanol	MERCK	เยอรมนี
23. ชุดน้ำยา Taq DNA polymerase	New England biolab (NEB)	สหราชอาณาจักร
24. ชุดน้ำยา Pfu DNA polymerase	Fermentas	สหรัฐอเมริกา
25. Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)	Fermentas	สหรัฐอเมริกา
26. ชุดน้ำยา Impromt™ II reverse transcriptase	Promega	สหรัฐอเมริกา
27. RNase AWAY (for RNase decontamination)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
28. เอนไซม์ Deoxyribonuclease I (DNase I), Amplification Grade	Promega	สหรัฐอเมริกา
29. RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas	สหรัฐอเมริกา
30. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
31. Restriction enzyme, HindIII	Fermentas	แคนาดา
32. Restriction enzyme, XbaI	New England biolab (NEB)	สหราชอาณาจักร

33. Restriction enzyme, <i>NheI</i>	New England biolab (NEB)	สหราชอาณาจักร
34. pGEM-T [®] easy vector	Promega	สหรัฐอเมริกา
35. T4 DNA Ligase	Takara bio, Inc.	ญี่ปุ่น
36. GenePure LE Agarose	ISC BioExpress	สหรัฐอเมริกา
37. gene ruler 100-3000 bp DNA ladder	Fermentas	สหรัฐอเมริกา
38. Ethidium bromide	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
39. Acridine orange dye	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
40. n-butanol	MERCK	เยอรมนี
41. Sodium chloride	MERCK	เยอรมนี
42. Magnesium chloride	APS Finechem	ออสเตรเลีย
43. Sodium acetate	MERCK	เยอรมนี
44. Potassium acetate	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
45. Tris base	Biobasic	แคนาดา
46. Acetic acid	Biobasic	แคนาดา
47. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	BDH	สหราชอาณาจักร
48. Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagenti	อิตาลี
49. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
50. Ortho-phosphoric acid 85%	MERCK	เยอรมนี
51. Coomassie Brilliant Blue G-250 Dyes	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
52. Human Brain, Medulla Oblongata Total RNA	BD Biosciences	สหรัฐอเมริกา
53. ชุดนำยา Lipofectamine [™] 2000	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
54. ชุดนำยา PolyMAG	Chemicell GmbH	เยอรมนี
55. ชุดนำยา Luciferase Assay system	Promega	สหรัฐอเมริกา

3.2 การเตรียมและตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของ magnetoplex จากอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวก PMMA/PEI core-shell magnetic nanoparticles (mag-PEI NP) จับกับพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.2.1 การเตรียม magnetoplex

เตรียม stock solution ของ mag-PEI NP โดยละลายในน้ำให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปเตรียม complex กับพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid pGL3-basic vector containing CMV promoter/enhancer) (87) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน N/P ต่าง ๆ ได้แก่ 0.4, 0.8, 1.6, 4.3, 8.7 และ 17.5 (อัตราส่วน N/P โดยที่ N คือ ไนโตรเจนอะตอม ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอนุภาคนาโนและ P คือ หมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ) จากนั้นบ่มรวมกันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที mag-PEI NP และพลาสมิดดีเอ็นเอจะจับกันด้วยแรงกระทำระหว่างประจุ (electrostatic interaction) เกิดเป็น complex ที่เรียกว่า “magnetoplex”

3.2.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่าง mag-PEI NP และพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย DNA binding assay โดยใช้วิธีเจลอเล็กโตรโฟรีซิส

นำ magnetoplex ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน N/P ต่าง ๆ มาทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกัน โดยนำ magnetoplex มาผสมกับ 10X loading dye และนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอเล็กโตรโฟรีซิสใน 1% อะกาโรสเจล ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide เพื่อให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี ซึ่งถ้ามีการจับกันระหว่างดีเอ็นเอที่มีประจุเป็นลบและอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่มีประจุเป็นบวก จะทำให้โมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้น มีน้ำหนักมากขึ้น จึงเคลื่อนที่ได้ช้าลง สามารถเปรียบเทียบได้กับแถบพลาสมิดควบคุม (control plasmid)

3.2.3 การวัดขนาดและค่าประจุของ mag-PEI NP และ magnetoplex ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS ตามหลักการ dynamic light scattering

นำ mag-PEI NP และ magnetoplex ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน N/P ต่าง ๆ มาปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตรและนำมาวัดขนาดและค่าประจุของอนุภาคที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส pH 7.4 ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) ตามหลักการ dynamic light scattering ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการเคลื่อนที่ของอนุภาคตลอดเวลาแบบบราวน์เนียนจะส่งผลกระทบต่อความเข้มแสงที่กระเจิงจากอนุภาค อนุภาคขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้าทำให้เกิดความถี่ของแสงที่กระเจิงต่ำและอนุภาคขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็วมีความถี่ของแสงที่กระเจิงสูงกว่า ดังนั้น อนุภาคขนาดใหญ่อัตราการเปลี่ยนแปลงของแสงที่กระเจิงจะช้ากว่าสัญญาณที่ได้จากอนุภาคขนาดเล็ก จากนั้นความถี่ในการกระเพื่อมขึ้น-ลง

ของความเข้มแสงนี้จะถูกส่งไปยังหน่วยประมวลผล เพื่อนำไปคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เลื่อนตำแหน่ง (translation diffusion coefficient) และนำไปหาขนาดของอนุภาค

สำหรับการวัดค่าประจุนั้นจะวัดจากค่าศักย์ซีต้า (ζ -potential) ของอนุภาคโดยอาศัยสมการของเฮนรี่ (Henry's equation) ในการคำนวณ ในการวัดจะใช้หลักการ Laser Doppler Electrophoresis ร่วมกับ Phase Analysis Light Scattering (PALS) และอาศัยคิวเวตชนิดพิเศษที่มีหัววัดและลบในการวัดค่าศักย์ซีต้าทางอ้อม โดยจะวัดจากอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคเมื่อทำให้อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า เมื่อมีแสงไปตกกระทบอนุภาค ความแตกต่างเฟสของแสงเลเซอร์อ้างอิงและแสงเลเซอร์ที่กระเจิงจากอนุภาคที่มุม 17 องศา จะสามารถนำมาคำนวณหาค่า electrophoretic mobility เมื่อแทนค่าลงในสมการเฮนรี่ก็จะสามารถคำนวณหาค่าศักย์ซีต้าได้

ตัวอย่าง สมการของเฮนรี่ (Henry's equation)

$$U_E = 2\varepsilon z f(K_D)/3\eta$$

เมื่อ z คือ ศักย์ซีต้า

ε คือ ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก

U_E คือ อัตราเร็วของอนุภาคหรือ electrophoretic mobility ซึ่งได้จากการวัด

η คือ ความหนืด

$f(K_D)$ คือ ฟังก์ชันของเฮนรี่ (Henry's function) มีค่าประมาณ 1.5 หรือ 1.0

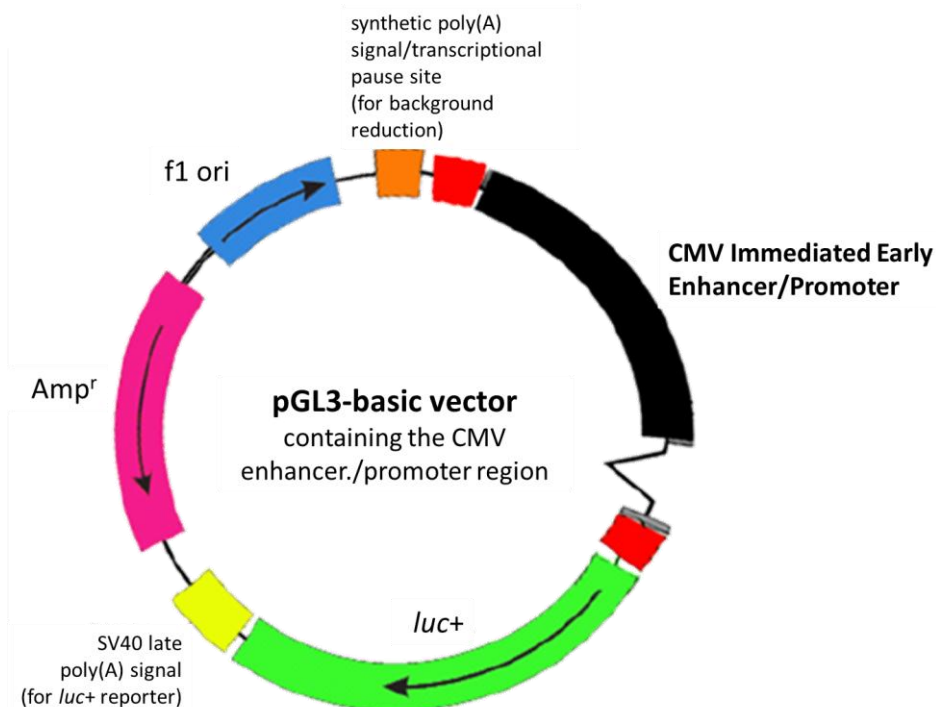
3.2.4 ตรวจสอบรูปร่างและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ magnetoplex ด้วย atomic force microscopy (AFM)

ศึกษารูปร่างและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ mag-PEI NP และ magnetoplex ในอัตราส่วน N/P 0.8 และ 4.3 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 ไมโครลิตร หยดสารละลายลงบนแผ่นไมกา ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์รูปร่างและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอม ด้วยเครื่อง AFM รุ่น SPA4000 (Seiko Instruments, Inc., Chiba, Japan) ซึ่งมีหลักการทำงาน คือ การผ่านแสงเลเซอร์ไปยังส่วนปลายแหลม (tip) ของคานยื่นที่มีขนาดระดับอะตอม ซึ่งส่วนปลายแหลมของคานนั้นจะไปสัมผัสแบบกระดกในทิศทางขึ้นและลงกับพื้นผิวของวัตถุ เมื่อเครื่อง AFM ลากส่วนปลายแหลมผ่านโครงสร้างระดับนาโน แรงปฏิกิริยาที่กระทำในแนวตั้งฉากที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมของพื้นผิวกับปลายแหลมจะดึงคาน ทำให้คานโก่งงอตัว จึงสามารถตรวจวัดขนาดของแรงเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างความสัมพัทธ์เชิงตำแหน่งของส่วนปลายแหลมและพื้นผิวของวัตถุ ทำให้สามารถทราบถึงระดับ

พลังงานที่เกิดขึ้นและถูกนำมาแปรสัญญาณร่วมกันเพื่อนำมาสร้างเป็นภาพพื้นผิวที่เป็นลักษณะเชิงโครงสร้างระดับอะตอมที่มีกำลังการขยายสูงไปแสดงบนจอภาพที่เป็นมอนิเตอร์

3.3 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมาก (Maxiprep)

การตรวจสอบประสิทธิภาพการนำส่งยีนโดยใช้ mag-PEI NP เป็นตัวพาจะใช้พลาสมิดดีเอ็นเอในการนำส่ง คือ พลาสมิด pGL-3-basic ที่บรรจุ CMV promoter/enhancer (ภาพที่ 3.1) โดยมียีน luciferase เป็นยีนรายงานผลซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ CMV (Cytomegalovirus) (87) พลาสมิดดีเอ็นเอถูกสกัดจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen, CA, USA) ตามหลักการ alkaline lysis เริ่มจากเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียโดย pre-cultured ใน TB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมนยา ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแบคทีเรียที่บ่มไว้มา main-cultured ใน LB broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมนยา ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมนสารละลาย resuspension buffer (R3), lysis buffer (L7) และ precipitation buffer (N3) อย่างละ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูเฉพาะส่วนใสเติมลงในคอลัมน์ ที่ทำการ equilibrated แล้ว ภายในคอลัมน์ จะมี anion-exchange resin จับกับประจุลบของดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใส ขณะที่สารอื่น ๆ จะถูกชะออกไปด้วย wash buffer 60 มิลลิลิตร จากนั้นดีเอ็นเอที่อยู่ในคอลัมน์จะถูกชะออกมาพร้อมกับ elution buffer 15 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 100% isopropanol ปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วมากกว่า 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 200-500 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Inc., MD, USA) และปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.1 พลาสมิด pGL-3-basic ที่บรรจุ CMV promoter/enhancer และยีน firefly luciferase reporter (87)

3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5

3.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5

ในการทดลองนี้จะใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง Human neuroblastoma cell line (LAN-5) เป็นเซลล์ต้นแบบในการทดลอง เพาะเลี้ยงเซลล์ LAN-5 ใน cell culture flask โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ชนิดกลูโคสความเข้มข้นต่ำ (Gibco, NY, USA) ที่มี 10% FBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) เลี้ยงในสภาวะควบคุมที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาณเซลล์ 80% ของพื้นที่โดยประมาณจากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงจะนำมาใช้ทำการทดลอง

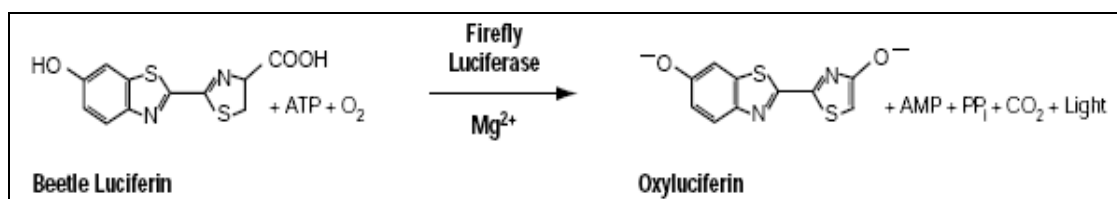
3.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5

เมื่อเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเจริญเต็มที่จึงทำ trypsinization เปลี่ยนถ่ายเซลล์ลงไป 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 150 ไมโครลิตร โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ 10% DMEM ใช้จำนวนเซลล์ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะติดจานเพาะเลี้ยง จึงเข้าสู่กระบวนการนำส่งยีนด้วย magnetoplex ตามอัตราส่วน N/P ที่เตรียมไว้

ในการนำส่งยีนจะอาศัยแรงแม่เหล็กจากภายนอกช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์โดยใช้ MagnetoFACTOR-96 plate (Chemicell, Berlin, Germany) เหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งยีนที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate และชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, CA, USA), PolyMAG (Chemicell, Berlin, Germany) และ naked DNA เพื่อยืนยันและเปรียบเทียบผลการทดลอง การนำส่งยีนโดยใช้น้ำยาแต่ละชนิด จะทำการทดลองจำนวนสามซ้ำ (triplicate) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (serum free medium) เมื่อทำการถ่ายโอนยีนที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เสร็จ จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบมีซีรัม และบ่มเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมงก่อนจะนำมาทำการตรวจวัด ในการประเมินประสิทธิภาพการนำส่ง magnetoplex เข้าสู่เซลล์ LAN-5 จะตรวจวัดจากค่าสัญญาณ luciferase ด้วย Luciferase assay system (Promega, WI, USA) และนำผลที่ได้มา normalization ด้วยการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ด้วย Bradford assay เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณค่า Relative Light unit (RLU) ให้มีความถูกต้องมากขึ้น

Luciferase assay

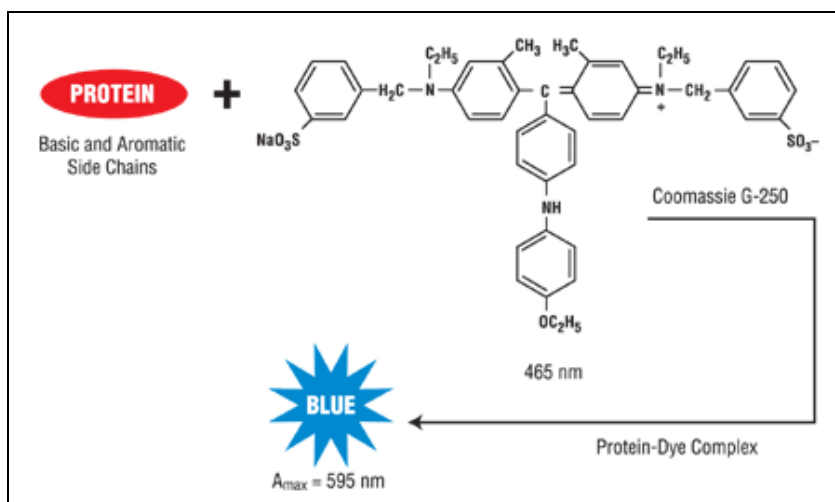
ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ pGL3-basic vector containing CMV enhancer promoter ซึ่งมียีนของเอนไซม์ firefly luciferase (luciferase reporter gene construct) (87) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวกในการนำส่งยีน โดยใช้ชุดน้ำยา Luciferase assay system (Promega, WI, USA) วัดการแสดงออกของยีน เอนไซม์ Firefly luciferase จะเข้าไปคะตะไลซ์ substrate คือ luciferin เกิดปฏิกิริยา oxidation เปลี่ยนเป็น oxyluciferin โดยมี ATP และ Mg^{2+} เป็น cosubstrate ช่วยในการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นพลังงานเคมีที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนเป็นพลังงานแสง จึงสามารถตรวจวัดการแสดงออกของยีนได้



ภาพที่ 3.2 การเกิดปฏิกิริยา bioluminescent จาก firefly luciferase (56)

Bradford assay

การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ด้วย Bradford assay มีหลักการ คือ สี Coomassie Brilliant Blue G-250 หรือ Bradford's reagent ภายใต้สภาวะกรดจะมีสีออกน้ำตาลแดง แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีนในสิ่งตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน เมื่อมีปริมาณกรดอะมิโนมากสีจะยิ่งเข้มมากขึ้น โดยสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของสีได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร



ภาพที่ 3.3 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสี Coomassie Brilliant Blue G-250 กับโปรตีน (88)

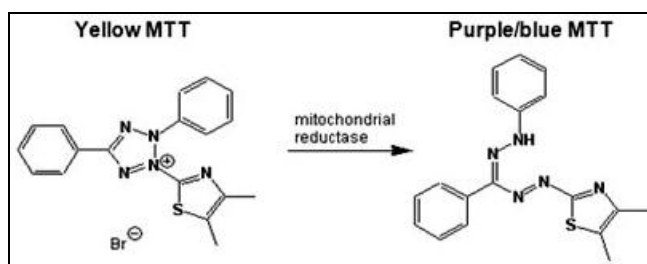
3.4.3 ประเมินความเป็นพิษของ mag-PEI NP ต่อเซลล์ LAN-5

ประเมินความเป็นพิษของ magnetoplex ต่อเซลล์ LAN-5 โดยนำเซลล์ที่ถ่ายโอนยีนเข้าไปแล้วตามวิธีในข้อ 3.4.2 มาประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (colorimetric assays) ในเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถผลิตเอนไซม์ mitochondrial reductase มารีดิวซ์สาร MTT ซึ่งเป็นสารสีเหลือง เกิดเป็นตะกอน formazan สีม่วง สามารถละลายตะกอน formazan ด้วยสารตัวทำละลาย เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ปริมาณตะกอนจะแปรผันตามปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้

ในการประเมินความเป็นพิษของ magnetoplex ต่อเซลล์ LAN-5 จะใช้น้ำยา MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5 นำมากรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน โดยจะนำน้ำยา MTT มาทดสอบกับเซลล์ที่ถ่ายโอนยีนแล้วเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมปริมาตร 200 ไมโครลิตร แต่ละหลุม

จะมีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำยา MTT เป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นป่มเซลล์ร่วมกับน้ำยา MTT ต่ออีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด ระวังอย่าให้โดนตะกอนติดมาและละลายตะกอน formazan สีม่วงที่เกิดขึ้นด้วย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้ตะกอนละลายใน DMSO จนหมดและนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายส่วนบนปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรและคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ดังนี้

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{ความเข้มสีที่วัดจากตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มสีจากกลุ่มควบคุม}} \times 100$$



ภาพที่ 3.4 การเกิดปฏิกิริยา oxidation โดยเอนไซม์ mitochondrial reductase (57)

3.4.4 ตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค

เพื่อยืนยันและตรวจติดตามการนำส่งยีนโดยใช้ mag-PEI NP เป็นตัวพา จะทำการตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคโดยนำ mag-PEI NP มาติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ rhodamine-B-Isothiocyanate (RITC) (Mirus Bio LLC, WI, USA) mag-PEI NP จะถูกนำมาเตรียม magnetoplex กับ พลาสมิดดีเอ็นเอในอัตราส่วน N/P ที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.4.2 จากนั้นนำส่ง magnetoplex เข้าสู่เซลล์ เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate (Chemicell, Berlin, Germany) เป็นเวลา 60 นาที ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม เมื่อครบเวลาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบมีซีรัมและป่มเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง ในการตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคจะนำเซลล์ LAN-5 มาย้อมด้วยสี acridine orange ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อดูโครงร่างของเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และนำมาตรวจสอบด้วยกล้อง confocal laser scanning microscope (CLSM) LSM 700 (Carl zeiss, Berlin, Germany) โดยสี RITC มี excitation ที่ 546 นาโนเมตร และ emission ที่ 576 นาโนเมตร สำหรับสี acridine orange มี excitation ที่ 405 นาโนเมตร และ emission ที่ 525 นาโนเมตร ผลการตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคจะถูกวิเคราะห์และประมวลผลด้วยโปรแกรม LSM 700 ZEN 2009

3.5 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของ magnetoplex ด้วย TAT peptide และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ magnetoplex /TAT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5

3.5.1 การเตรียม magnetoplex /TAT peptide

เลือก magnetoplex ในอัตราส่วน N/P ที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงสุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำจากการทดลองในข้อ 3.4.2 และ 3.4.3 เพื่อนำมาทดสอบการนำส่งยีนร่วมกับการใช้ TAT peptide ในขั้นแรก mag-PEI NP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะถูกนำมาเตรียม magnetoplex โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid pGL3-basic vector containing CMV promoter/enhancer (87) ตามอัตราส่วน N/P ที่เหมาะสม บ่มรวมกันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผสม TAT peptide ในสารแขวนลอยของ magnetoplex ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่าง ๆ คือ 1.25, 2.50, 5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที จะได้ complex ของ TAT peptide ที่เคลือบบน magnetoplex เกิดเป็น magnetoplex/TAT peptide complex อย่างสมบูรณ์

3.5.2 การวัดขนาดและค่าประจุของ magnetoplex/TAT peptide ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS ตามหลักการ dynamic light scattering

นำ complex ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วนต่าง ๆ มาปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดขนาดและค่าประจุของอนุภาคที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) ตามหลักการ dynamic light scattering ที่กล่าวไปในข้อ 3.2.3

3.5.3 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของ magnetoplex ด้วย TAT peptide ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5

เพาะเลี้ยงเซลล์ LAN-5 ตามสภาวะที่กล่าวไปแล้วข้างต้น เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่จึงทำ trypsinization เปลี่ยนถ่ายเซลล์ลงใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 150 ไมโครลิตร โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ 10% DMEM ใช้จำนวนเซลล์ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะติดจานเพาะเลี้ยง จึงเข้าสู่กระบวนการนำส่งยีนด้วย complex ตามอัตราส่วนที่เตรียมไว้ (ข้อ 3.5.1) ในการนำส่งยีนจะอาศัยแรงแม่เหล็กจากภายนอกช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์โดยใช้ MagnetoFACTOR-96 plate (Chemicell, Berlin, Germany) ที่เวลา 60 นาที เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งยีนที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate และชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, CA, USA), PolyMAG (Chemicell, Berlin, Germany) และ naked DNA เพื่อยืนยัน

และเปรียบเทียบผลการทดลอง การนำส่งยีนโดยใช้น้ำยาแต่ละชนิดจะทำการทดลองจำนวนสามซ้ำ (triplicate) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (serum free medium) เมื่อทดสอบการนำส่งยีนที่เวลาต่าง ๆ เสร็จ จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบมีซีรัมและปมเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมงก่อนจะนำมาทำการตรวจวัด ในการประเมินประสิทธิภาพการนำส่ง comtoplex เข้าสู่เซลล์ LAN-5 จะตรวจวัดจากค่าสัญญาณ luciferase ด้วย Luciferase assay system (Promega, WI, USA) และนำผลที่ได้มา normalization ด้วยการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยใช้ Bradford assay เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณค่า Relative Light unit (RLU) ให้มีความถูกต้องมากขึ้น

3.5.4 ประเมินความเป็นพิษของ magmetoplex /TAT ต่อเซลล์ LAN-5

ประเมินความเป็นพิษของ complex ต่อเซลล์ LAN-5 โดยนำเซลล์ที่ถ่ายโอนยีนเข้าไปแล้วตามวิธีในข้อ 3.5.3 มาประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay ตามหลักการที่กล่าวไปในข้อ 3.4.3

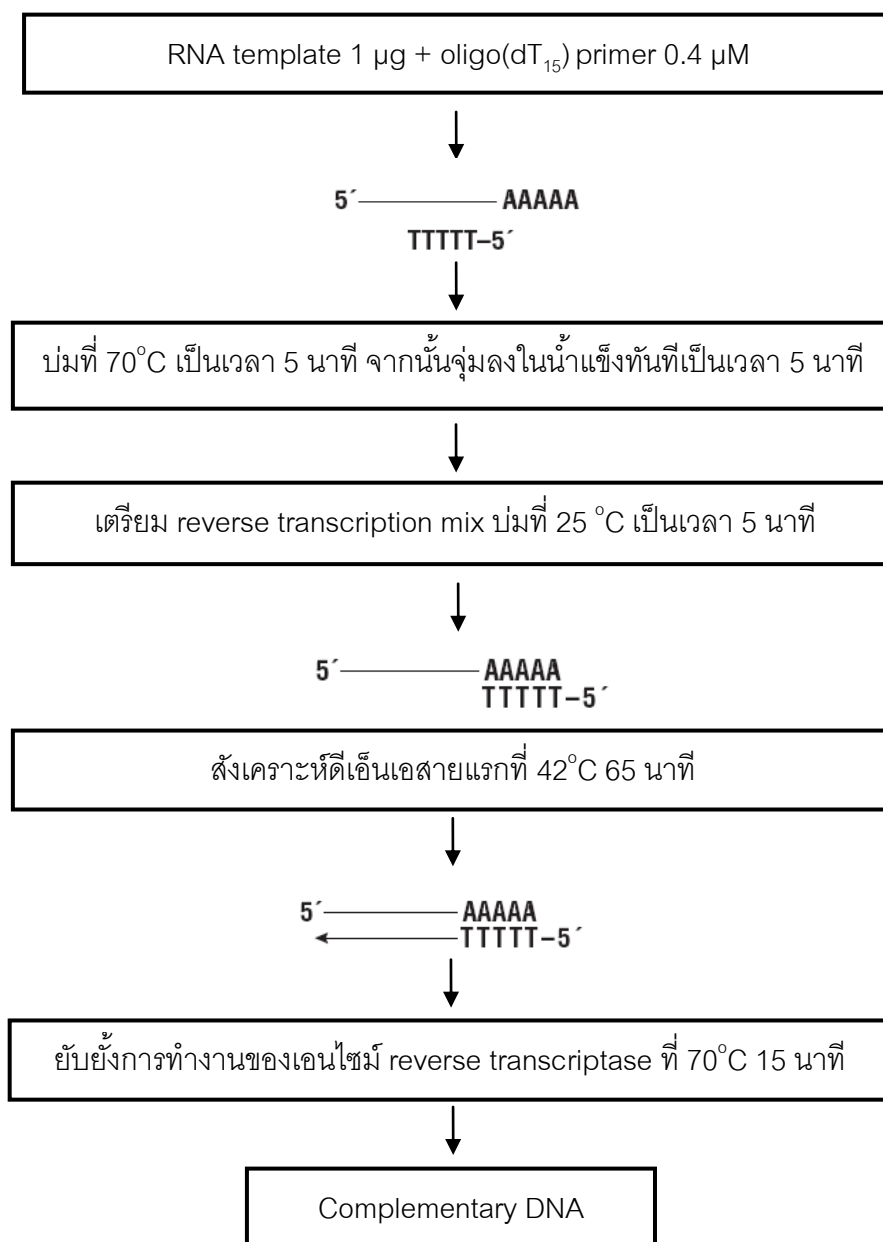
3.6 ศึกษาประสิทธิภาพในการนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5

3.6.1 โคลนยีน TPH-2 และการสร้างเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีน TPH-2 (pGL3-CMV-TPH-2)

ในการตรวจติดตามประเมินผลระบบนำส่งยีนที่พัฒนาขึ้นเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านยีนบำบัดนั้น ขั้นตอนแรกได้โคลนยีน TPH-2 ซึ่งมีส่วนสำคัญในการผลิตเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์สารสื่อประสาทซีโรโทนิน โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ Human Brain, Medulla Oblongata Total RNA (CLONTECH cDNA panels, BD Biosciences, NJ, USA) เป็นแม่แบบ และใช้เอนไซม์ ImPromt-II™ reverse transcriptase (Promega, WI, USA) ในการสังเคราะห์ ในปฏิกิริยา RT-PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- 1 µg Human brain medulla oblongata (BD Biosciences, NJ, USA)
- 1X Improm-II™ reaction buffer (Promega, WI, USA)
- 0.4 µM primer (oligo dT₁₅) (Bio basic, Inc., Ontario, Canada)
- 1.5 mM MgCl₂ (APS Finechem, MA, USA)
- 0.5 mM dNTP mix (Promega, WI, USA)
- 1 µl Improm-II™ reverse transcriptase (Promega, WI, USA)
- 20 U Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, MD, USA)

ขั้นตอนของ RT-PCR มีดังนี้



เมื่อได้ cDNA แล้ว ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน TPH-2 ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะต่อยีน TPH-2 ได้แก่ Tph2-*NheI*_pGL-CMV มีลำดับเป็น 5'-CCT gCT AgC gCC TTC CTC TCA ATC TC-3' และ Tph2-*XbaI*_pGL-CMV มีลำดับเป็น 5'-CCC gCT CTA gAT AgT TCC Agg CAT CAA ATC C-3' ผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้มีขนาด 1,585 bp ในการทำ PCR (ตารางที่ 3.4) ปฏิกริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

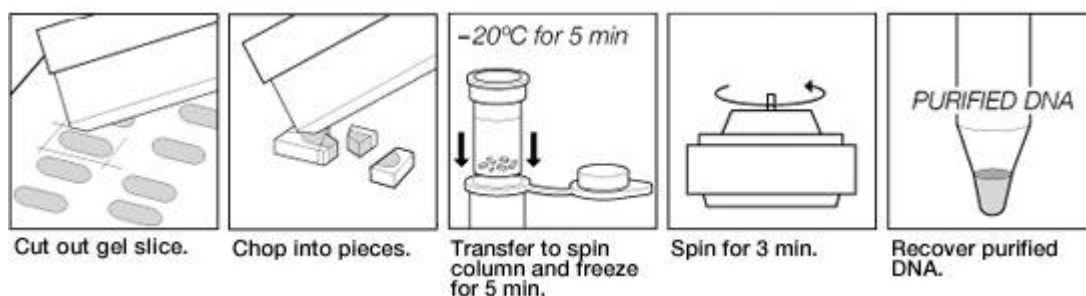
- 1.3x *Pfu* Buffer (Fermentas, MD, USA)
- 2.6 mM MgSO₄ (Fermentas, MD, USA)
- 5% DMSO (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- 2 mM dNTP mix (Fermentas, MD, USA)
- 0.5 μM primer (Bio basic, Inc., Ontario, Canada)
- 0.625 U Taq DNA polymerase (Fermentas, MD, USA)
- 0.3125 U *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, MD, USA)
- 5 ไมโครลิตร cDNA template

เนื่องจาก *Pfu* DNA polymerase มี 2.6×10^{-6} errors per nt per cycle ซึ่งต่ำกว่า Taq DNA polymerase แต่การใช้ *Pfu* DNA polymerase จะได้ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR มีปลายเป็น blunt end ดังนั้นจึงผสม Taq DNA polymerase ลงไปเติมในปฏิกิริยา ทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีปลายเป็น A tail สามารถเชื่อมต่อกับ pGEM-T[®] easy vector (Promega, WI, USA) ได้โดยตรง โดยมีสภาวะสำหรับการทำ PCR ดังนี้

95°C	2 min	}	35 cycles
95°C	30 sec		
65°C	30 sec		
68°C	2 min		
68°C	10 min		
4°C	α		

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์ PCR จึงสกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุด Freeze 'N Squeeze Spin Columns (Bio-Rad, CA, USA) (ภาพที่ 3.6) ตัดเจลบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการและหั่นเจลเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำชิ้นเจลที่ได้ย้ายไปยังคอลัมน์ของชุดสกัด บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาปั่นเหวี่ยงจึงนำน้ำส่วนใสที่ได้จากการปั่นมาตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) เติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตรเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตด (pH 5.5) 10 ไมโครลิตร และเติม 100% เอทานอล 220 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที 10 นาที เมื่อครบเวลาดังตกตะกอนด้วย 70% เอทานอล 200 ไมโครลิตร ตกตะกอนให้แห้ง โดยใช้

Speed Vac เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำ 10-20 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอจากเจล (89)

เมื่อตกตะกอนดีเอ็นเอแล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับ pGEM-T[®] easy vector (Promega, WI, USA) ในปฏิกิริยา ligation reaction 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- 1x Rapid Ligation buffer (Promega, WI, USA)
- 25 ng pGEM-T[®] easy vector (Promega, WI, USA)
- 3 Weiss units T4 DNA Ligase (Takara bio, Inc., Shiga, Japan)
- DNA template

นำ ligation reaction ที่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมน้ำให้ครบ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *Escherichia coli* ด้วยวิธี electroporation โดยนำ ligation reaction ที่เตรียมไว้มาเติม n-butanol 200 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วตากตะกอนให้แห้ง โดยใช้ Speed Vac เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำแบคทีเรียผสมกับ ligation reaction แล้วดูสัดส่วนที่ได้ใส่ electroporation cuvettes ขนาด 0.1 เซนติเมตร ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1800 โวลต์ เมื่อถ่ายโอนเสร็จรีบเติม LB-broth ที่เย็น แล้วจึงนำแบคทีเรียไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแบคทีเรีย spread ลงบน LB agar ที่มี X-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (Bio basic, Inc., Ontario, Canada) และ IPTG 40 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (US Biological, MA, USA) บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12-16 ชั่วโมง จากนั้นจึงคัดเลือกพลาสมิดที่มีการเชื่อมต่อกับชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีโคลน PCR ในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- 1.3x *Pfu* Buffer (Fermentas, MD, USA)
- 2.6 mM MgSO₄ (Fermentas, MD, USA)
- 5% DMSO (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- 2 mM dNTP (Fermentas, MD, USA)
- 0.5 μM primer (SP6, T7) (Bio basic, Inc., Ontario, Canada)
- 0.625 U Taq DNA polymerase (Fermentas, MD, USA)

สภาวะสำหรับการทำ PCR เป็นดังนี้

94°C	3 min	} 35 cycles
94°C	30 sec	
50.1°C	30 sec	
70°C	2 min	
70°C	5 min	
4°C	α	

จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมาเลี้ยงต่อใน LB-broth ที่มี Ampicillin เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาสกัดพลาสมิดด้วยชุด NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany) และยืนยันผลการโคลนยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *XbaI* โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย

- Buffer2 (NEB, Hertfordshire, UK)
- 10x BSA (1มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (NEB, Hertfordshire, UK)
- *NheI* (10 unit) (Fermentas, MD, USA)
- *XbaI* (20 unit) (NEB, Hertfordshire, UK)
- Template

นำพลาสมิดที่ตัดเอนไซม์บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และตรวจสอบผลการทดลองด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสหลังจากได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการภายหลังจากถูกตัดเอนไซม์แล้วให้แยกชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายออกจากเจลด้วยชุด Freeze 'N Squeeze Spin Columns (Bio-Rad, Hercules, USA) ตามวิธีที่กล่าวไปแล้วข้างต้น จากนั้นจึงย้ายยีนเป้าหมายที่ได้สู่ pGL3-basic containing CMV promoter/enhancer ซึ่งมีการดัดแปลงให้มี CMV promoter/enhancer region เพื่อปรับปรุงการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์ (87)

โดยเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับ pGL3-basic containing CMV promoter/enhancer ในปฏิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- 1X Rapid Ligation buffer (Promega, WI, USA)
- 3 Weiss units T4 DNA Ligase (Takara bio, Inc., Shiga, Japan)
- pGL3-basic containing CMV promoter/enhancer cut with *HindIII*, *XbaI*
- DNA template

นำ ligation reaction ที่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง แล้วถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *Escherichia coli* ด้วยวิธี electroporation ตามที่กล่าวไปข้างต้น เมื่อถ่ายโอนเสร็จจึงเติม LB-broth ที่เย็น แล้วจึงนำแบคทีเรียไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแบคทีเรีย spread ลงบน LB agar ที่มี X-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (Bio basic, Inc., Ontario, Canada) และ IPTG 40 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (US Biological, MA, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12-16 ชั่วโมง จากนั้นจึงคัดเลือกพลาสมิดที่มีการเชื่อมต่อกับชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีโคลนนิ่ง PCR เลี้ยงเชื้อจากโคลนนิ่งที่เลือกได้ใน LB-broth ที่มี Ampicilin เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาสกัดพลาสมิดด้วยชุด NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany) ยืนยันผลการโคลนนิ่งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *XbaI* จากนั้นตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อยืนยันความถูกต้องเป็นลำดับสุดท้าย จึงได้พลาสมิดที่บรรจุยีน TPH-2 ให้ชื่อว่า pGL2-CMV-TPH-2

3.6.2 การนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ LAN-5

สกัดพลาสมิด pGL3-CMV-TPH-2 ด้วยชุดน้ำยา PureLink[™] HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen, CA, USA) ตามหลักการ alkaline lysis ที่ได้กล่าวไปข้างต้น เมื่อเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเจริญเต็มที่จึงทำ trypsinization เปลี่ยนถ่ายเซลล์ลงไปใน 6-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร โดยใช้จำนวนเซลล์ 7.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดจานเพาะเลี้ยง จึงเข้าสู่กระบวนการถ่ายโอนยีนโดยใช้ mag-PEI NP/DNA ในอัตราส่วน N/P ที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงสุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำจากการทดลองในข้อ 3.4.2 และ 3.4.3 เช่นเดียวกับการถ่ายโอน magnetoplex/TAT peptide ซึ่งเลือกในอัตราส่วนที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงสุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำจากการทดลองในข้อ 3.5.3 และ 3.5.4 เป็นตัวพาในการนำส่งยีน

TPH-2 เข้าสู่เซลล์ LAN-5 ขั้นตอนการนำส่งยีนจะอาศัยแรงแม่เหล็กจากภายนอกช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์โดยใช้ MagnetoFACTOR-96 plate (Chemicell, Berlin, Germany) ที่เวลา 60 นาที เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate, ชุดนำยาถ่ายโอนทางการค้าที่เป็น liposome-based carrier คือ Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, CA, USA), ชุดนำยาถ่ายโอนทางการค้าที่เป็น magnetic-coated polymeric carrier คือ PolyMAG (Chemicell, Berlin, Germany) และ naked DNA เพื่อยืนยันและเปรียบเทียบผลการทดลองการนำส่งยีนโดยใช้น้ำยาแต่ละชนิดทำการทดลองจำนวนสามซ้ำ (triplicate) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (serum free medium) เมื่อทำการถ่ายโอนยีนเสร็จจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบมีซีรัมและบ่มเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 18, 24 ชั่วโมง 3 และ 7 วันก่อนจะนำมาทำการตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ด้วย RT-PCR

3.6.3 การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ที่ทำการนำส่งยีน TPH-2 แล้วมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ชั้นแรกล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (HyClone, CA, USA) 2 ครั้ง แล้วเติมน้ำยา TRIzol (Invitrogen, CA, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในจานเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปิเปตสารละลายเซลล์ที่ได้ใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม chloroform ที่เย็นลงไป 200 ไมโครลิตร ต่อปริมาตรน้ำยา TRI-Reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นล่างสุดของหลอดคือชั้นที่มีสีแดงซึ่งเป็นชั้นของ organic phase (phenol-chloroform phase) ถัดขึ้นมาเป็นชั้น interphase และบนสุดคือชั้นน้ำส่วนใสเป็นชั้นของ aqueous phase ซึ่งอาร์เอ็นเอจะอยู่ในชั้นนี้ จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสชั้นบนสุดมาทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 100% Isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อปริมาตรน้ำยา TRI-Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 75% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วไม่เกิน 7,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที สุดท้ายตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase (DEPC-treated water) ที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ซึ่งสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 ที่นำส่งเข้าสู่เซลล์ LAN-5 โดยใช้ตัวพาชนิดต่าง ๆ จากการทดลองในขั้น 3.6.2 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Impromt II™ reverse transcription (Promega, WI, USA) ซึ่งการทดลองนี้ใช้ยีนควบคุมคือ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ขั้นแรกนำตะกอนอาร์เอ็นเอที่สกัดแยกได้จากเซลล์ในขั้น 3.6.3 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Inc, MD, USA) และนำมาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจากขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ Deoxyribonuclease I (DNase I) (Promega, Madison, USA) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

น้ำยา	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)
10X DNase I Reaction buffer	1
DNase I	1
DEPC-treated water	6
RNA (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
รวมปริมาตรทั้งหมดเป็น 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	
25 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8.0	1
บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที	

จากนั้นอาร์เอ็นเอที่ผ่านการกำจัดดีเอ็นเอ จะถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกริยา RT-PCR ซึ่งเริ่มจากการเปลี่ยนสารพันธุกรรมจากอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA ในการทดลองนี้ใช้ชุดน้ำยา Impromt II™ reverse transcriptase และใช้ Oligo dT(T₁₇) ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์เป็นไพรเมอร์ในการทำปฏิกริยาดังตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา คือ 25 องศาเซลเซียส 5 นาที, 42 องศาเซลเซียส 65 นาที และ 70 องศาเซลเซียส 15 นาที

ตารางที่ 3.2 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อสร้าง cDNA จากอาร์เอ็นเอ

น้ำยา	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)
DEPC-treated water	1.3
Improm-II™ 5X Reaction Buffer	4
1.5 mM MgCl ₂	1.2
10 mM dNTP Mix	1
10 µM Oligo dT(T ₁₇)	1
40 unit RiboLock	0.5
Improm-II™ Reverse Transcriptase	1
RNA	10
รวมปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร	

จากนั้นนำ cDNA ที่ได้จากการทำปฏิกริยามาใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 และมียีนควบคุมคือ GAPDH (ตารางที่ 3.3) สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาสำหรับยีน TPH-2 คือ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที (1 รอบ); denaturation 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที; annealing 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที; extension 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที (35 รอบ); post-extension 68 องศาเซลเซียส 10 นาที (1 รอบ) และสำหรับยีน GAPDH มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา คือ pre-denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที (1 รอบ); denaturation 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที; annealing 55 องศาเซลเซียส 15 วินาที; extension 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที (35 รอบ); post-extension 72 องศาเซลเซียส 15 นาที (1รอบ) ในการทำปฏิกริยาจะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะต่อยีน TPH-2 และยีนควบคุม GAPDH ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจศึกษา

น้ำยา	ปริมาตรต่อ 14 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)	
	TPH-2	GAPDH
Milli-Q water	122.94	122.94
10X Standard Buffer	-	22.75
10X ThermoPol Buffer	22.75	-
DMSO	8.75	8.75
10 mM dNTP Mix	3.5	3.5
10 μ M Forward primer	0.875	0.875
10 μ M Reward primer	0.875	0.875
Taq DNA polymerase	1.31	1.31
cDNA	1	1
รวมปริมาตรสุดท้าย 12.5 ไมโครลิตร		

ขั้นตอนสุดท้ายทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ย้อมเจลด้วยสาร ethidium bromide และถ่ายภาพเจลที่ได้ด้วยจากเครื่องถ่ายภาพเจล G:box chemi (Syngene, Cambridge, UK) เพื่อวิเคราะห์การแสดงผลออกด้วยโปรแกรม GeneTools (Syngene, Cambridge, UK)

ตารางที่ 3.4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการโคลนยีนและตรวจสอบการแสดงออกของยีน

Primer	Sequence	Product (bp)	References
GAPDH Sense	5'-GACCACAGTCCATGCCATCACT-3'	452	Divy and Pillai; 2006 (90)
GAPDH Anti-sense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'		
TPH-2 Sense	5'- AACCACACTATTGTGACGCTGAATCC TCCAGAGAA-3'	217	This study
TPH-2 Anti-sense	5'- ACCCATAACCCATCGCCACATCCA CAAAA-3'		

3.7 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

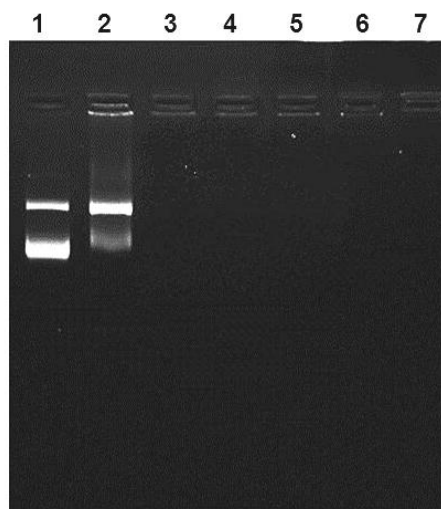
งานวิจัยนี้ในแต่ละการทดลองจะทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง (triplicate) นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้หลักการทางสถิติ Independent Samples *t*-test ในการประเมินประสิทธิภาพและความเป็นพิษของตัวพาชนิดต่าง ๆ ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5 เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งโดยอาศัยแรงแม่เหล็กและปราศจากแรงแม่เหล็กช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีน และใช้หลักการทางสถิติ One-Way ANOVA ตามด้วย Tukey's HSD multiple comparison test ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน TPH-2 ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ โดยใช้ตัวพาต่างชนิดกันเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนโดยใช้ naked DNA เพียงอย่างเดียว โดยพิจารณาที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมและตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของ magnetoplex จากอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวก PMMA/PEI core-shell magnetic nanoparticles (mag-PEI NP) จับกับ พลาสมิดดีเอ็นเอ

4.1.1 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่าง mag-PEI NP และพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย DNA binding assay โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส



ภาพที่ 4.1 การจับกันระหว่าง mag-PEI NP และพลาสมิดดีเอ็นเอที่อัตราส่วน N/P ต่าง ๆ ด้วย DNA binding assay แถวที่ 1 คือ แถวพลาสมิดควบคุม pGL3-basic vector containing CMV promoter/enhancer ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แถวที่ 2-7 คือ mag-PEI NP/DNA magnetoplex ในอัตราส่วน N/P 0.4, 0.8, 1.6, 4.3, 8.7 และ 17.5 ตามลำดับ

จากการทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่าง mag-PEI NP และพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA binding assay (ภาพที่ 4.1) เมื่อดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จับกับ mag-PEI NP เกิดเป็น complex ที่มีอัตราส่วน N/P เป็น 0.4, 0.8, 1.6, 4.3, 8.7 และ 17.5 ผลการทดลองพบว่าที่ N/P 0.4 อนุภาค mag-PEI NP ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ ทำให้ดีเอ็นเออิสระที่เหลืออยู่สามารถเคลื่อนที่ให้เห็นแถบดีเอ็นเอบนเจลได้ (แถวที่ 2) แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วน N/P มากขึ้นมีผลให้ดีเอ็นเอถูกหน่วงการเคลื่อนที่มากขึ้น จึงไม่พบแถบดีเอ็นเอปรากฏบนเจล (แถวที่ 2-7) ผลการทดลองพบว่าอนุภาคสามารถจับกับดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ เริ่มต้นที่ N/P 0.8 (แถวที่ 3) ทั้งนี้เนื่องจากประจุบวกซึ่งเป็นองค์ประกอบของผิวอนุภาคสามารถ

จับกับประจุลบของดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ผ่านแรงกระทำระหว่างประจุ (electrostatic interaction) เกิดเป็น complex ที่เรียกว่า “magnetoplex” ซึ่งมีค่าประจุเป็นบวก เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสจากขั้วลบไปยังขั้วบวกก็จะถูกหน่วงไว้ ทำให้ไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้เห็นบนเจล เมื่อนำไปส่องภายใต้แสงยูวีและเปรียบเทียบกับแถบพลาสมิดควบคุม (control plasmid)

4.1.2 ขนาดและค่าประจุของ mag-PEI NP และ magnetoplex จากการวัดด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS ตามหลักการ dynamic light scattering

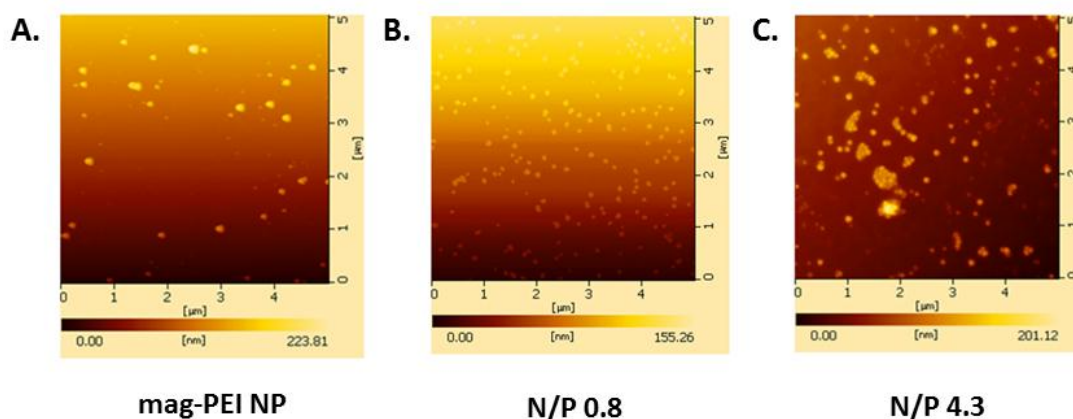
ในการวัดขนาดและค่าประจุของ magnetoplex จะนำ magnetoplex ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน N/P ต่าง ๆ มาปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร นำมาวัดขนาดและค่าประจุที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส pH 7.4 ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) ตามหลักการ dynamic light scattering ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.1) พบว่า mag-PEI NP มีขนาดประมาณ 123.8 ± 3.1 นาโนเมตร มีความเป็นประจุบวกสูงวัดค่าได้ประมาณ 39.3 ± 1.9 มิลลิโวลต์ โดย mag-PEI NP มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อจับกับพลาสมิดดีเอ็นเอเกิดเป็น magnetoplex ที่ N/P ตั้งแต่ 0.4 - 17.5 พบว่าขนาดของ magnetoplex ที่ได้อยู่ในช่วง 215-370 นาโนเมตร และค่าประจุ (ζ -potential) มีการเปลี่ยนแปลงไปตาม N/P อันสะท้อนให้เห็นถึงความเสถียรทางไฟฟ้า (electrically stability) ของ magnetoplex ที่อยู่ในรูปสารแขวนลอย กล่าวคือในช่วง N/P เท่ากับ 0.4 เป็นช่วงที่ดีเอ็นเอเริ่มมีการเกาะรอบอนุภาค แต่ยังไม่สมบูรณ์ ζ -potential ที่ได้จึงมีค่าต่ำ (6.3 ± 1.7 มิลลิโวลต์) และ magnetoplex จะมีความเสถียรขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อมีการเพิ่มปริมาณอนุภาคจนเกิดการจับอย่างสมบูรณ์และเสถียร ในช่วง N/P 0.8, 1.6 และ 4.3 ที่มี ζ -potential สูงขึ้นเป็น 25 ± 1.4 , 34.8 ± 2.3 และ 22.4 ± 3.2 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม หากเพิ่มปริมาณอนุภาคจนมากเกินไป เช่นที่ N/P 8.7 และ 17.5 ค่า ζ -potential ลดลงเป็น 5.6 ± 0.5 และ 3.3 ± 0.7 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ซึ่งในเห็นว่า magnetoplex ไม่มีความเสถียร อนุภาคส่วนเกินจะเกิดการเกาะกลุ่มกันและมีบางส่วนที่ไม่สามารถจับได้อย่างสมบูรณ์ค่าประจุรวมที่วัดได้จึงมีค่าลดลง

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจวัดขนาดและประจุของอนุภาค mag-PEI NP และ mag-PEI NP/DNA magnetoplex ตั้งแต่ N/P 0.4-17.5

ตัวอย่าง	อัตราส่วน N/P	ขนาด (นาโนเมตร)	ค่าประจุ (มิลลิโวลต์)	ค่าดัชนีการ กระจายตัวของ อนุภาค)
mag-PEI NP		123.8 ± 3.1	39.3 ± 1.9	0.26 ± 0.02
mag-PEI NP/DNA	0.4	231.3 ± 24.7	6.3 ± 1.7	0.36 ± 0.03
	0.8	370.0 ± 32.4	25.0 ± 1.4	0.45 ± 0.05
	1.6	298.5 ± 65	34.8 ± 2.3	0.75 ± 0.15
	4.3	286.8 ± 23.3	22.4 ± 3.2	0.42 ± 0.06
	8.7	251.3 ± 5.1	5.6 ± 0.5	0.34 ± 0.06
	17.5	215.4 ± 17.5	3.3 ± 0.7	0.36 ± 0.05

4.1.3 ผลการตรวจสอบรูปร่างและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ magnetoplex ด้วย atomic force microscopy (AFM)

ผลการทดลองจากการทำ DNA binding assay รวมทั้งการวัดขนาดและค่าประจุของ magnetoplex ที่อัตราส่วน N/P ต่าง ๆ พบว่าอนุภาค mag-PEI NP สามารถเริ่มจับดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์และเสถียรที่ N/P 0.8 และเสถียรโดยเริ่มมีการรวมกลุ่มที่ N/P 4.3 จึงเตรียม magnetoplex ที่ทั้งสอง N/P ดังกล่าว เพื่อตรวจสอบรูปร่างและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ magnetoplex ที่เกิดขึ้นเทียบกับอนุภาค mag-PEI NP ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.2 พบว่า magnetoplex ที่อัตราส่วน N/P 0.8 และ 4.3 เกิดเป็น magnetoplex ระหว่างอนุภาคนาโนและดีเอ็นเอเกิดขึ้นจริง สามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้อง AFM รูปร่างของ magnetoplex ที่ได้จาก N/P 0.8 มีลักษณะกลม มีขนาดเล็ก และมีการกระจายตัวได้ดี เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ mag-PEI NP ในการจับกับดีเอ็นเอจาก N/P 0.8 เป็น 4.3 อนุภาคมีการจับกลุ่ม มีขนาดหลากหลายซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดขนาดและค่าประจุของ magnetoplex ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS



ภาพที่ 4.2 รูปร่างของและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ magnetoplex ภายใต้การตรวจสอบโดย AFM ภาพ A คือ mag-PEI NP ที่ไม่มีการจับกับดีเอ็นเอ, ภาพ B และ C คือ magnetoplex N/P 0.8 และ 4.3 ตามลำดับ

4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5

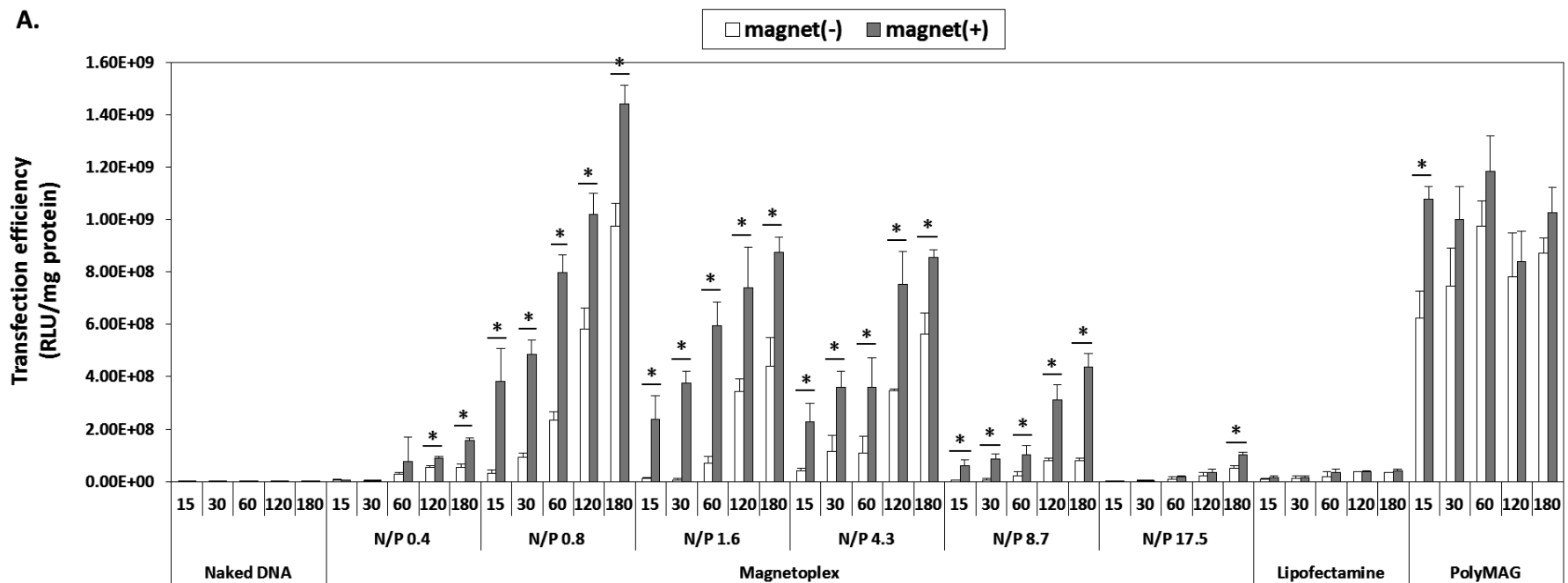
4.2.1 ผลการประเมินประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5

ภายหลังจากศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของอนุภาค mag-PEI NP แล้วพบว่ามีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวพานำส่งยีน จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5 โดยเตรียม magnetoplex ตั้งแต่อัตราส่วน N/P 0.4-17.5 เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งยีนที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate (Chemicell, Berlin, Germany) และชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, CA, USA), PolyMAG (Chemicell, Berlin, Germany) และ Naked DNA ที่ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที ผลการทดลอง (ภาพที่ 4.3A) เมื่อคำนวณออกมาเป็นค่า Relative Light unit (RLU) พบว่า magnetoplex ในทุกอัตราส่วน N/P มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อใช้แรงแม่เหล็กช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีน โดย magnetoplex ในอัตราส่วน N/P 0.8 มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงสุด จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการนำส่งยีนโดยใช้ mag-PEI NP เป็นตัวพาจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการเหนี่ยวนำให้นานขึ้น (time-dependent induction) แต่สำหรับ PolyMAG ซึ่งเป็นชุดน้ำยาถ่ายโอนยีนทางการค้าในระบบ magnetofection นั้นใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำค่อนข้างสั้นก็สามารถนำส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ได้ เมื่อทำการเพิ่ม

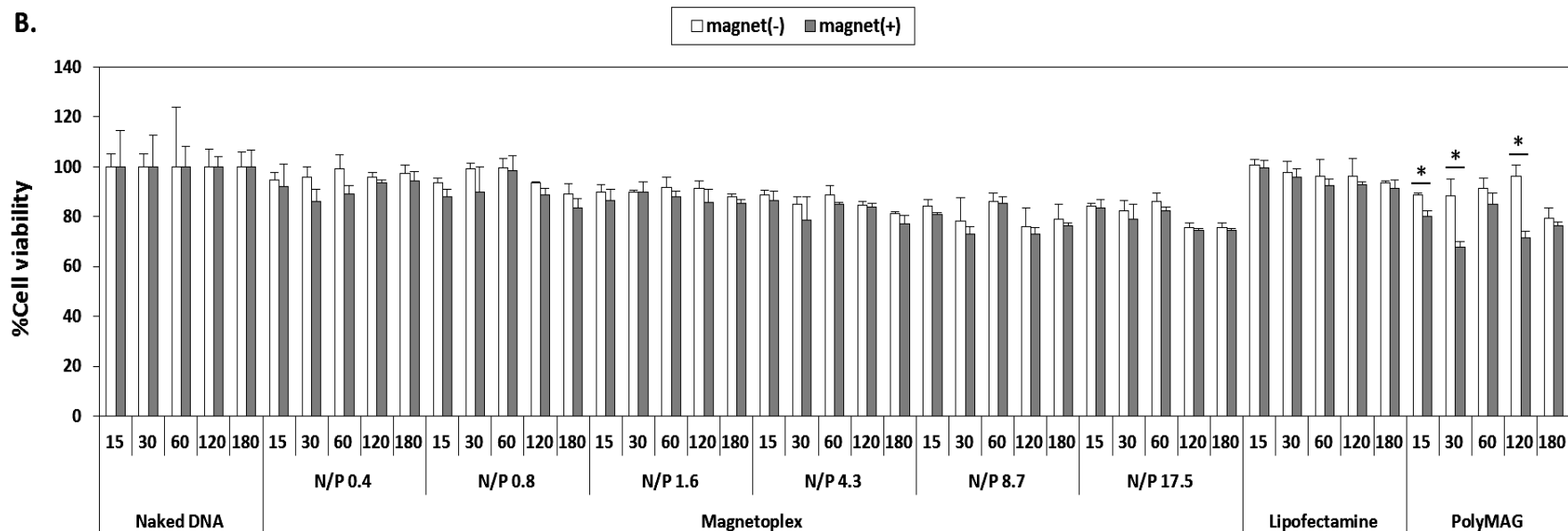
เวลาจาก 15 นาทีจนถึง 180 นาที ผลการถ่ายโอนยีนเมื่อเหนี่ยวนำด้วยเวลาที่ต่างกันจึงมีความแตกต่างกันไม่มากนัก ทั้งนี้เนื่องจาก PolyMAG มีคุณสมบัติความเป็นแม่เหล็กค่อนข้างสูง จึงให้ผลการทดลองที่แตกต่างจาก mag-PEI NP อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มเวลาในการเหนี่ยวนำยีนเป็น 120 นาที mag-PEI NP ให้ผลการทดลองในระดับที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับชุดนำยา PolyMAG และสูงมากขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาจนถึง 180 นาที นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่าเมื่อเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนเป็นเวลา 60 นาที mag-PEI NP มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงกว่า Lipofectamine 2000™ ซึ่งเป็นชุดนำยาถ่ายโอนยีนทางการค้าในระบบ liposome-based system และพบว่าการนำส่งยีนโดยใช้ Lipofectamine 2000™ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการนำส่งที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate (ภาพที่ 4.3A) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของ Lipofectamine 2000™ นั้น จะดีที่สุดหากเหนี่ยวนำการถ่ายโอนเป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมงตามวิธีการมาตรฐานแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต

4.2.2 ผลการประเมินความเป็นพิษของ mag-PEI NP ต่อเซลล์ LAN-5

ในการประเมินความเป็นพิษของ magnetoplex ต่อเซลล์ LAN-5 ได้ทำการทดลองในรูปแบบเดียวกับการศึกษาประสิทธิภาพในการนำส่งยีน และตรวจสอบผลโดยใช้วิธี MTT assay ผลการทดลองพบว่า mag-PEI NP เมื่อนำมาเตรียมเป็น magnetoplex กับดีเอ็นเอในทุกอัตราส่วน N/P มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ พบว่าด้วยความเข้มข้น mag-PEI NP ที่ใช้ยังทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในช่วงเวลาเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนเป็นเวลา 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที (ภาพที่ 4.3B) ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอนุภาค mag-PEI NP มีความเหมาะสมในการพัฒนานำมาใช้เป็นตัวพาสำหรับการนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัส เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (91, 92)



ภาพที่ 4.3 A การประเมินประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของ mag-PEI NP ในรูปแบบของ magnetoplex ที่ N/P 0.4-17.5 เมื่อเหนี่ยวนำการถ่ายโอนที่เวลา 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที โดยเปรียบเทียบกับชุดนำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000TM, PolyMAG และ naked DNA กราฟแท่ง □ และ ■ แสดงการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและถูกเหนี่ยวนำการถ่ายโอนด้วย MagnetoFACTOR plate ตามลำดับ เครื่องหมาย * แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและถูกเหนี่ยวนำการถ่ายโอนด้วย MagnetoFACTOR plate เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้หลักการทางสถิติ Independent Samples *t*-test

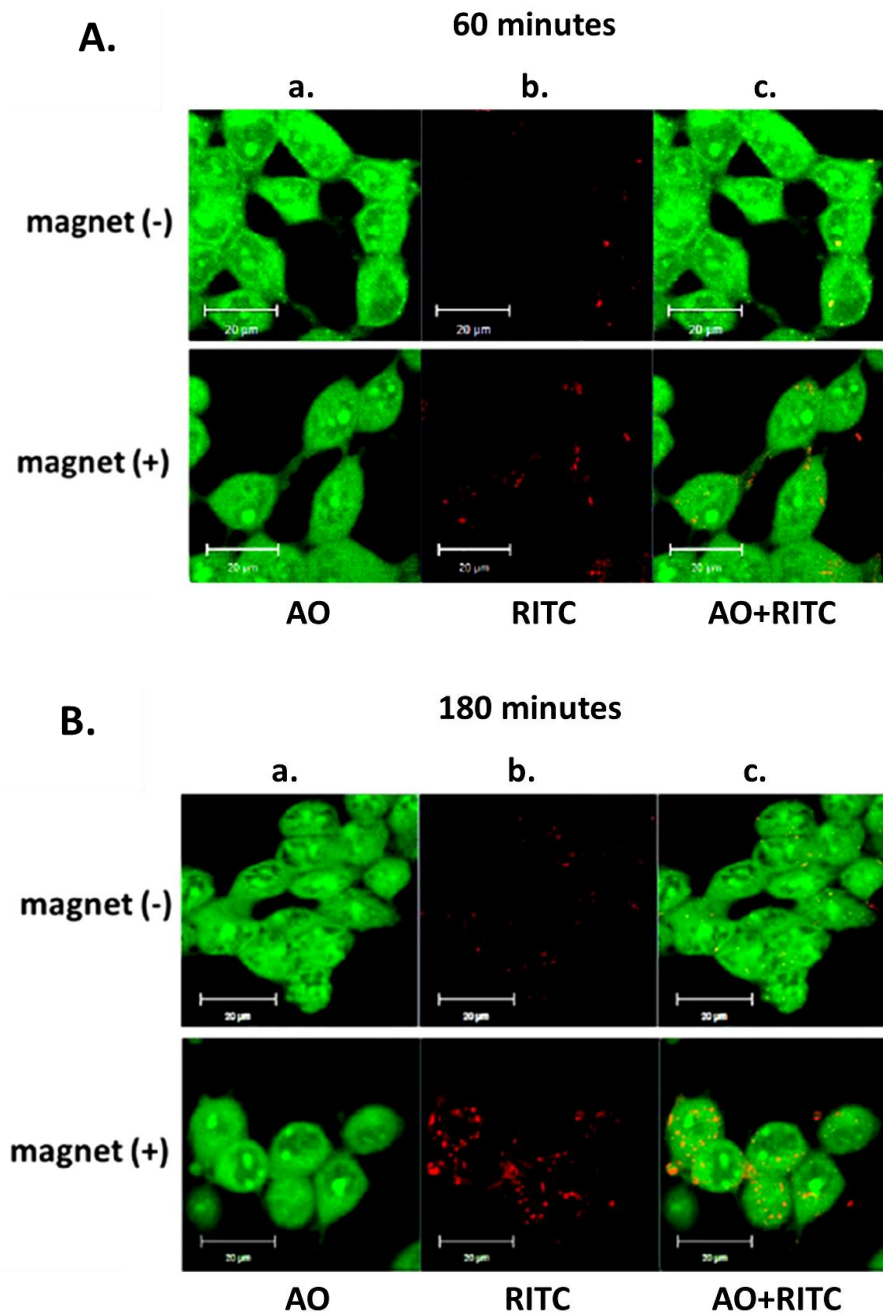


ภาพที่ 4.3 B การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ LAN-5 ของ mag-PEI NP ในรูปแบบของ magnetoplex ที่ N/P 0.4-17.5 เมื่อเหนี่ยวนำการถ่ายโอนที่เวลา 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที โดยเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000™, PolyMAG และ naked DNA กราฟแท่ง □ และ ■ แสดงการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและถูกเหนี่ยวนำการถ่ายโอนด้วย MagnetoFACTOR plate ตามลำดับ เครื่องหมาย * แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและถูกเหนี่ยวนำการถ่ายโอนด้วย MagnetoFACTOR plate เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้หลักการทางสถิติ Independent Samples *t*-test

4.3 ผลการตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค

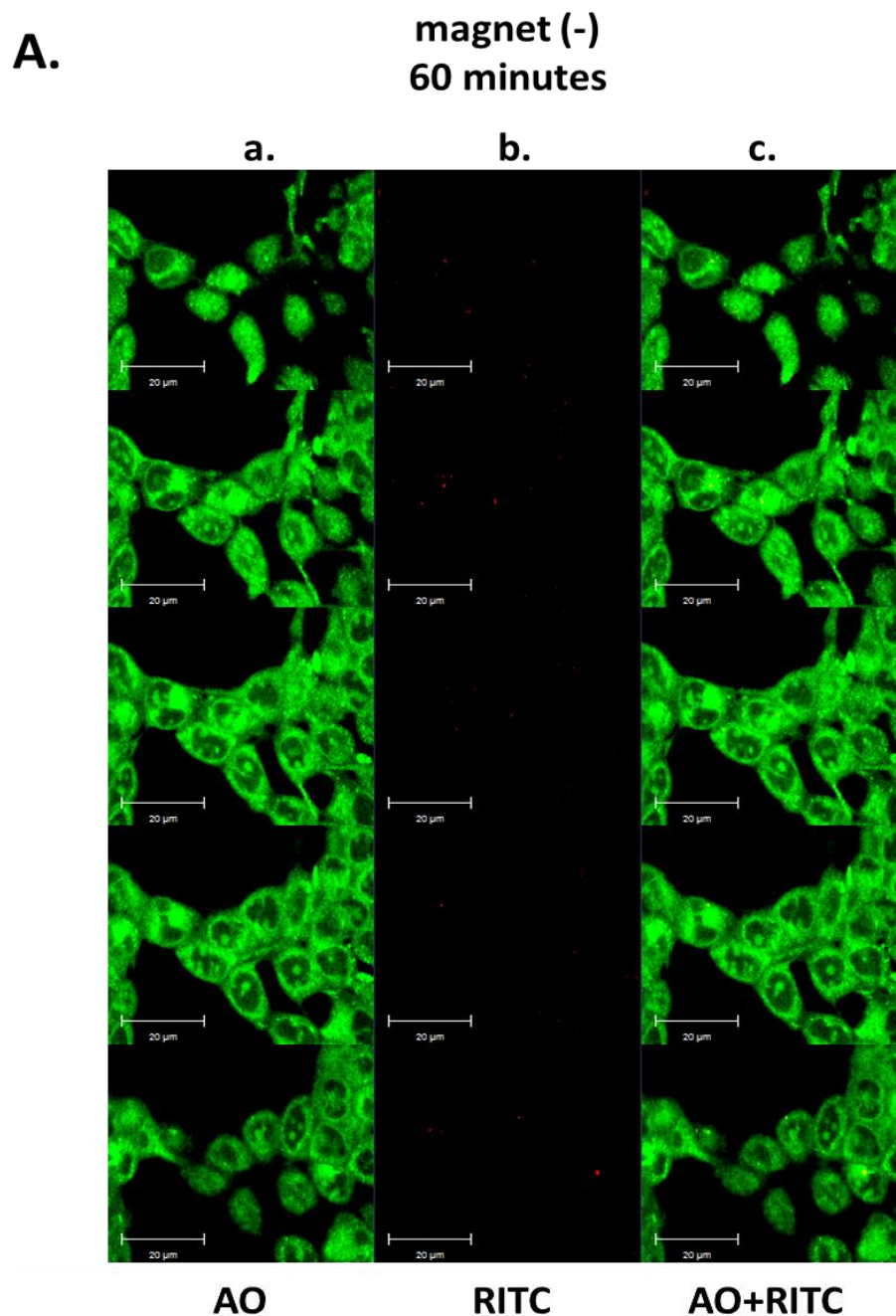
จากการศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาค mag-PEI NP ในการนำส่งเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นตัวพาสำหรับการนำส่งยีนและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ magnetoplex N/P 0.8 ภายใต้การเหนี่ยวนำจากแรงแม่เหล็ก ซึ่งจะช่วยให้ magnetoplex สัมผัสกับผิวเซลล์ได้รวดเร็ว การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์จึงประสบผลสำเร็จ เพื่อเป็นการยืนยันและตรวจติดตามการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์จึงได้นำ mag-PEI NP มาติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ เตรียมเป็น magnetoplex กับพลาสมิดดีเอ็นเอในอัตราส่วน N/P 0.8 และผลการตรวจสอบภายใต้กล้อง CLSM ในเวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการนำส่งยีนเปรียบเทียบระหว่างการนำส่งที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate (Chemicell, Berlin, Germany) เป็นเวลา 60 และ 180 นาที

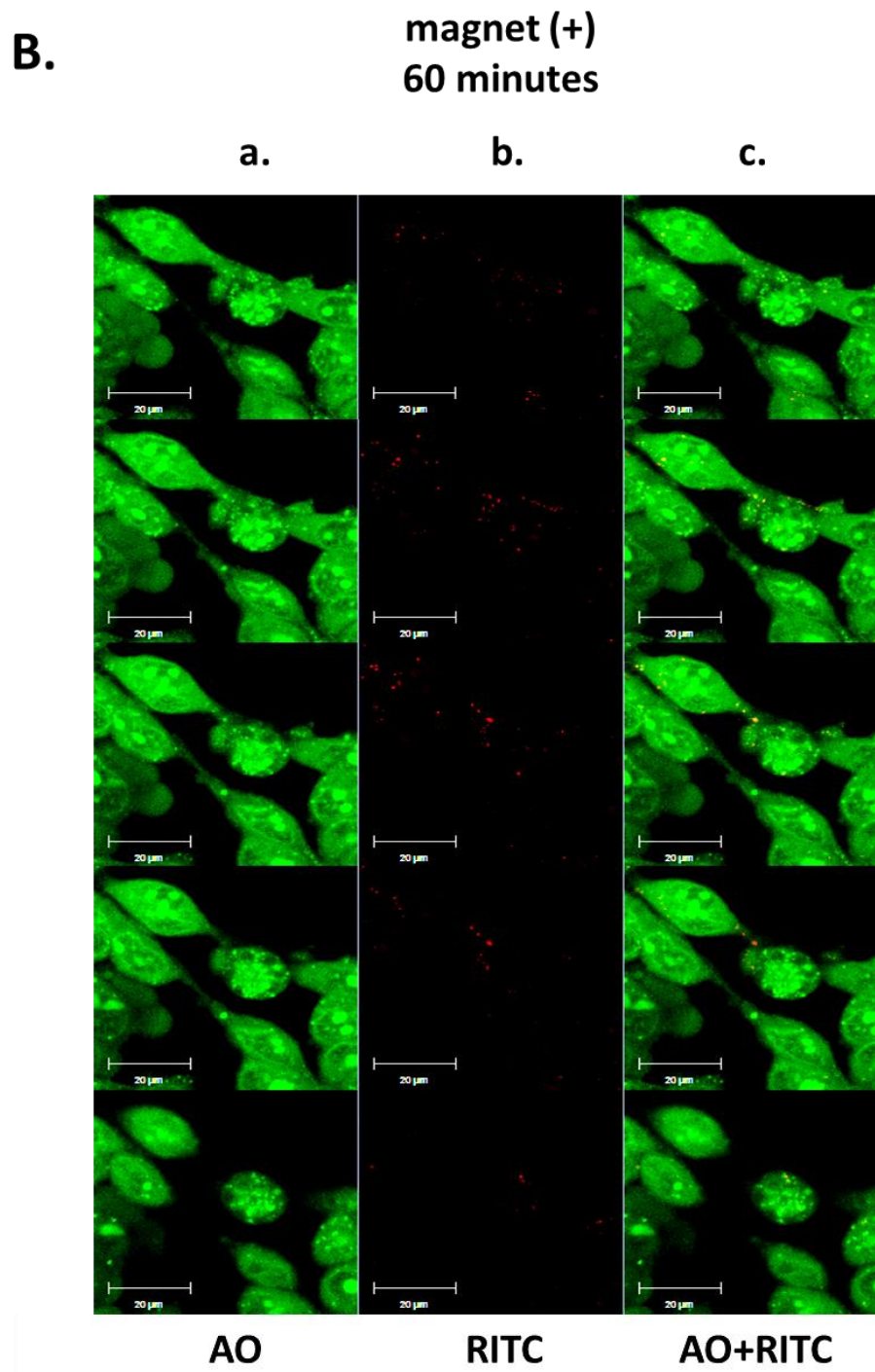
ผลการทดลองพบว่า mag-PEI NP สามารถใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนได้ดีโดยสามารถนำส่งดีเอ็นเอให้เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ จากภาพภายใต้กล้อง CLSM (ภาพที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่ามีความหนาแน่นของ magnetoplex ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้แรงแม่เหล็กจากภายนอกช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนและเร่งการตกของดีเอ็นเอ เพื่อสัมผัสกับผิวเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ทั้งการเหนี่ยวนำโดยใช้เวลาที่ 60 และ 180 นาที โดย magnetoplex ส่วนใหญ่เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์และมีบางส่วนสามารถเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ได้



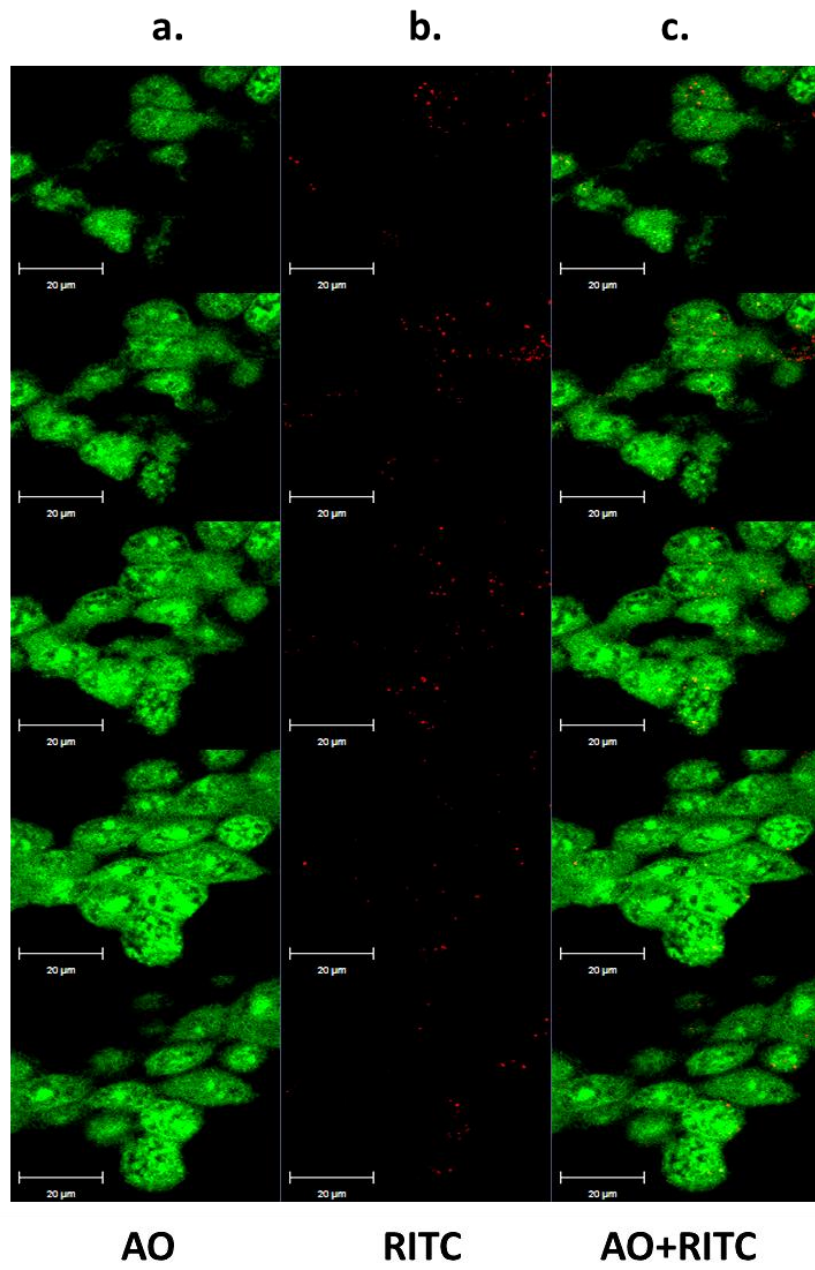
ภาพที่ 4.4 การตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค mag-PEI NP ภายใต้กล้อง CLSM โดยเปรียบเทียบระหว่างการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำ (magnet -) และถูกเหนี่ยวนำ (magnet +) การถ่ายโอนยีนด้วย MagnetoFACTOR plate ที่เวลา 60 นาที (ภาพ A) และ 180 นาที (ภาพ B) เซลล์ LAN-5 ที่ย้อมด้วยสี acridine orange (AO) คือบริเวณสีเขียว และ mag-PEI NP ที่ติดฉลากด้วย สี RITC ปรากฏเป็นจุดสีแดง โดยแถว a คือ เซลล์ LAN-5 ที่ย้อมด้วยสี AO แถว b คือ mag-PEI NP ที่ติดฉลากด้วยสี RITC และแถว c คือ การซ้อนภาพระหว่างเซลล์ LAN-5 และ mag-PEI NP ปรากฏให้เห็นทั้งสี AO และ RITC

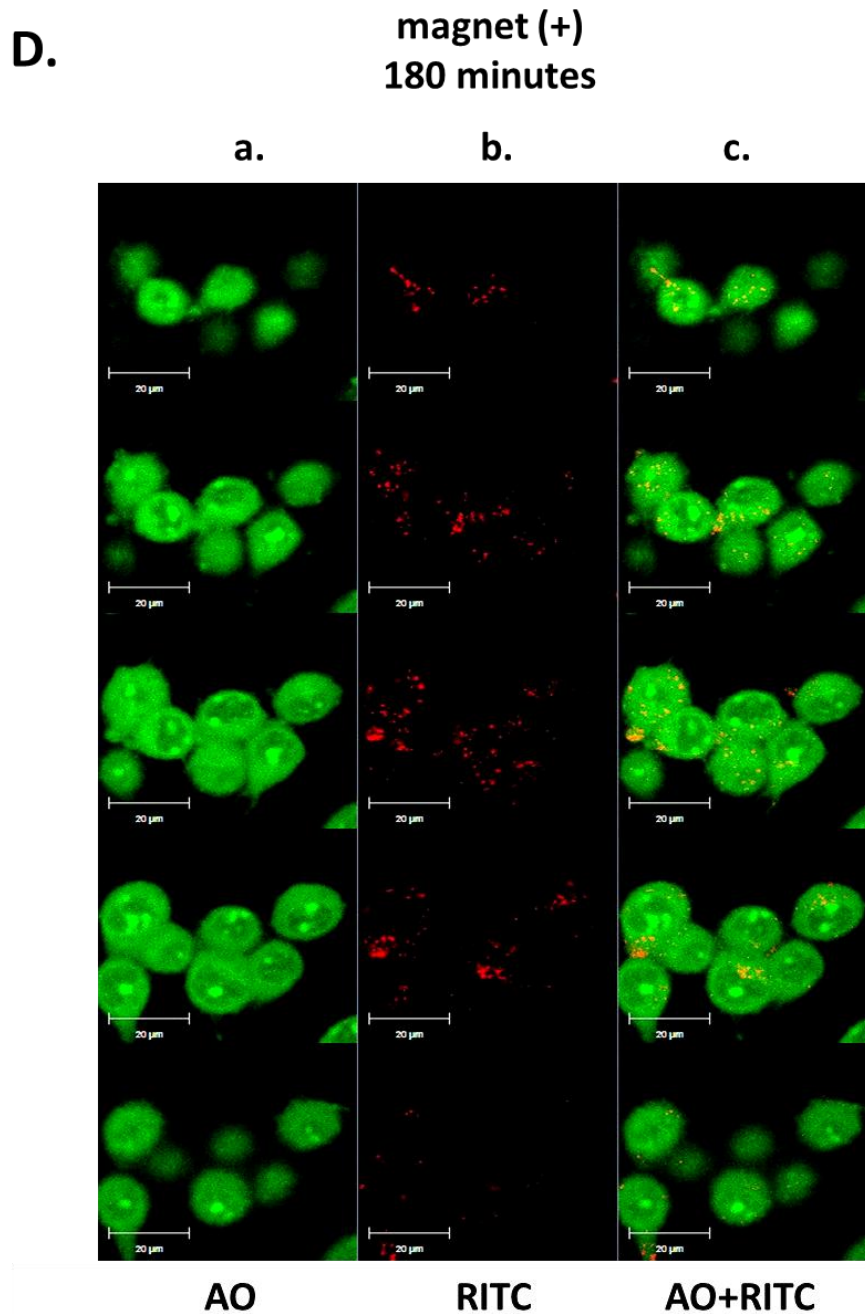
นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคโดยใช้ภาพในรูปแบบ Z-stack (ภาพที่ 4.5 A-D) ซึ่งกล้อง CLSM จะถ่ายภาพโดยตัดผ่านพื้นผิวของเซลล์ในแต่ละระดับ แสดงให้เห็นการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่สามารถแทรกผ่านเข้าสู่เซลล์ได้จริง โดยจากผลการทดลองพบว่า มีความสอดคล้องกับการประเมินประสิทธิภาพในการนำส่งยีนโดยใช้ Luciferase assay ซึ่งจะมีประสิทธิภาพการนำส่งยีนสูงขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนจาก 60 นาที เป็น 180 นาที





C. magnet (-)
180 minutes



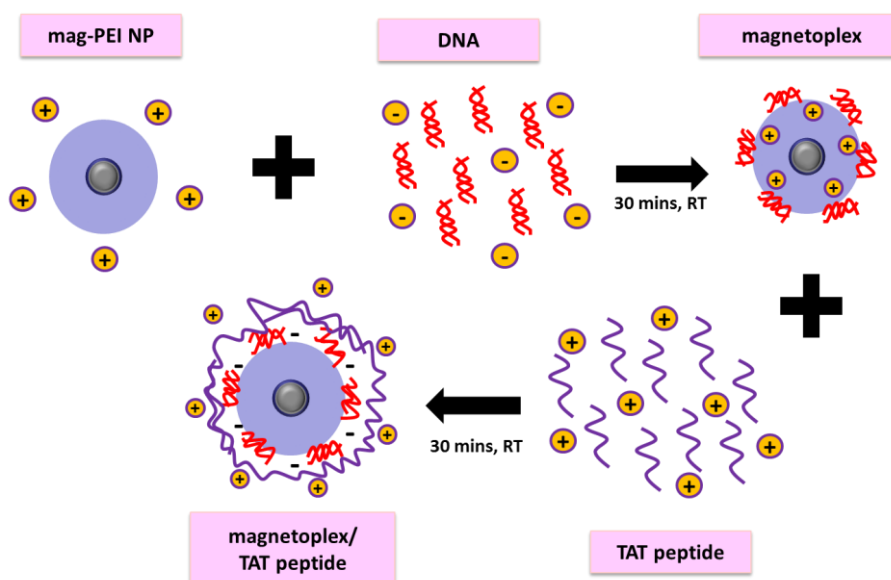


ภาพที่ 4.5 การตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค mag-PEI NP ภายใต้กล้อง CLSM โดยใช้รูปแบบ Z-stack เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำ (magnet -) และถูกเหนี่ยวนำ (magnet +) การถ่ายโอนยีนด้วย MagnetoFACTOR plate ที่เวลา 60 นาที (ภาพ A และ C) และ 180 นาที (ภาพ B และ D) เซลล์ LAN-5 ที่ย้อมด้วยสี acridine orange คือบริเวณสีเขียว และ mag-PEI NP ที่ติดฉลากด้วยสี RITC ปรากฏเป็นจุดสีแดง โดยแถว a คือ เซลล์ LAN-5 ที่ย้อมด้วยสี AO แถว b คือ mag-PEI NP ที่ติดฉลากด้วยสี RITC และแถว c คือ การซ้อนภาพระหว่างเซลล์ LAN-5 และ mag-PEI NP ปรากฏให้เห็นทั้งสี AO และ RITC

4.4 การเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของ magnetoplex ด้วย TAT peptide และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ magnetoplex /TAT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5

4.4.1 ขนาดและค่าประจุของ magnetoplex/TAT จากการวัดด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS ตามหลักการ dynamic light scattering

จากการประเมินประสิทธิภาพและความเป็นพิษต่อเซลล์ของ mag-PEI NP พบว่า mag-PEI NP ที่จับกับพลาสมิดดีเอ็นเอเกิด magnetoplex ในอัตราส่วน N/P 0.8 จะมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงสุด อีกทั้งยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำด้วย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งให้มากยิ่งขึ้นจึงได้เลือก magnetoplex ในอัตราส่วนนี้มาทดสอบการนำส่งยีนร่วมกับ TAT peptide โดยในการทดลองนี้ได้ผสม TAT peptide ในสารแขวนลอยของ magnetoplex ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่าง ๆ คือ 1.25, 2.50, 5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้เป็น complex ของ TAT peptide ที่เคลือบบน magnetoplex ด้วยหลักการ layer-by-layer coating เกาะเป็นชั้นด้วย electrostatic interaction (ภาพที่ 4.6) เกิดเป็น magnetoplex/TAT complex จากนั้นจึงตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของ complex โดยการวัดขนาดและค่าประจุ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อเตรียม complex โดยมีการใช้ TAT peptide ร่วมกับ magnetoplex นั้น ขนาดของ complex จะเล็กลงและมีความเป็นประจุบวกเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในช่วงที่เติม TAT ปริมาณ 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขนาดที่เล็กลงและ ค่าประจุที่สูงขึ้นนี้น่าจะมาจากการที่ TAT peptide เป็นตัวช่วยให้ magnetoplex ขดตัวแน่นยิ่งขึ้น เนื่องจากเมื่อประจุบวกของ TAT จับกันได้ดีกับดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบ ทำให้มีการขดแน่นของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดเคลือบอยู่รอบพื้นผิวของอนุภาค อย่างไรก็ตาม การเติม TAT peptide ปริมาณมากเกินไปก็จะมีแนวโน้มทำลายความเสถียรของ complex ที่เกิดขึ้นได้เช่นกัน ดังจะเห็นได้จากการที่ magnetoplex/TAT complex มีการขยายขนาดและมีการลดของค่าประจุเมื่อเติม TAT ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กล่าวโดยสรุปคือปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของ TAT peptide ที่เหมาะสมสำหรับเตรียม magnetoplex/TAT คือ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียม complex ได้ขนาด 248 ± 21.3 นาโนเมตรและค่าประจุ 34.9 ± 3.0 มิลลิโวลต์



ภาพที่ 4.6 ภาพจำลองแสดงการจับกันระหว่าง mag-PEI NP, ดีเอ็นเอ และ TAT peptide ด้วยหลักการ layer-by-layer coating

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจวัดขนาดและประจุของ mag-PEI NP/DNA (magnetoplex) และ magnetoplex/TAT peptide

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นสุดท้าย ของ TAT peptide (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ขนาด (นาโนเมตร)	ค่าประจุ (มิลลิโวลต์)	ค่าดัชนีการ กระจายตัว ของอนุภาค)
mag-PEI NP/DNA N/P 0.8 (magnetoplex)		370.0 ± 32.4	25.0 ± 1.4	0.45 ± 0.05
magnetoplex/ TAT	1.25	237.5 ± 2.0	10.3 ± 2.7	0.35 ± 0.01
	2.5	270.1 ± 17.3	18.4 ± 3.7	0.31 ± 0.02
	5	248 ± 21.3	34.9 ± 3.0	0.34 ± 0.01
	2.5	214.2 ± 13.7	23.7 ± 4.8	0.44 ± 0.06
	5	199.3 ± 23.1	27.5 ± 6.6	0.68 ± 0.22
	100	185.9 ± 23.3	25.3 ± 10.0	0.58 ± 0.25
	150	215.1 ± 15.8	25.1 ± 8.6	0.42 ± 0.03

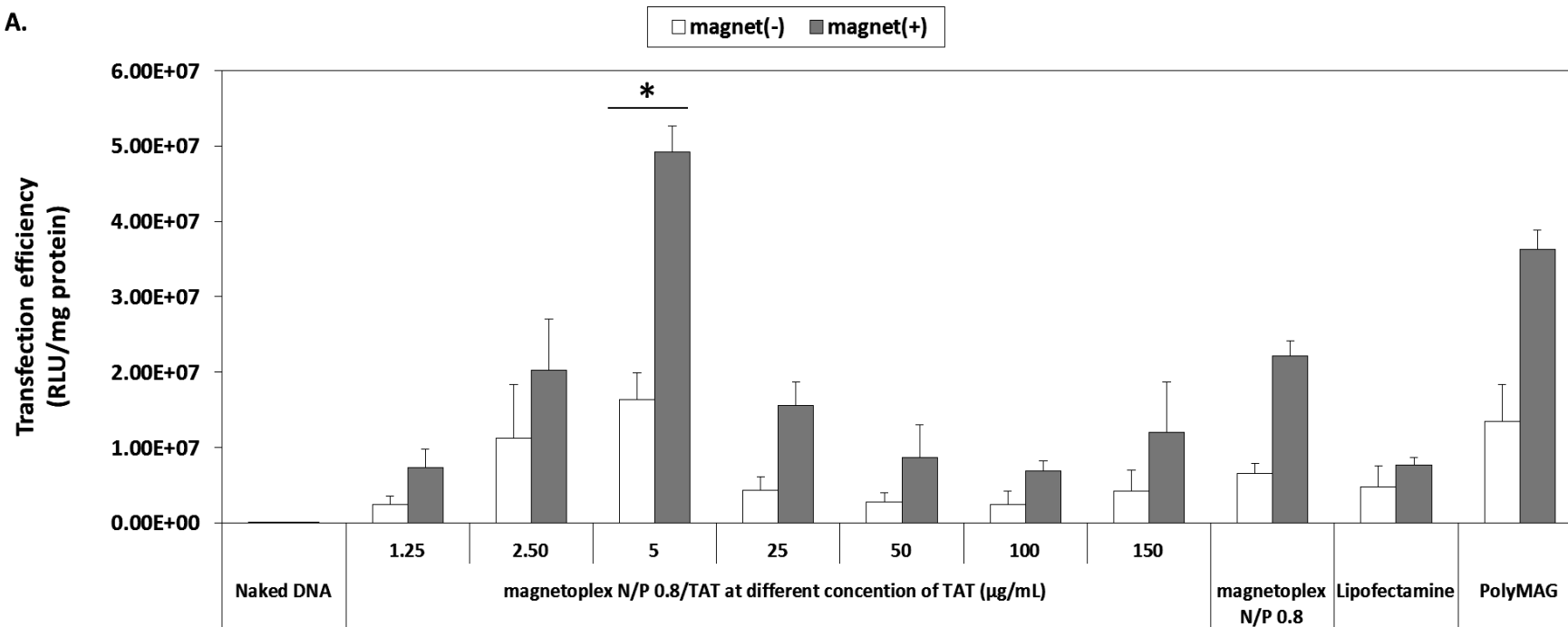
4.4.2 ผลการเสริมประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5 ด้วย TAT peptide

จากการประเมินประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ร่วมกับการใช้ TAT peptide ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5 เปรียบเทียบระหว่างการนำส่งยีนที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate (Chemicell, Berlin, Germany) ที่เวลา 60 นาที และชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, CA, USA), PolyMAG (Chemicell, Berlin, Germany) และ naked DNA ผลการทดลองพบว่า การนำส่งโดยใช้ mag-PEI NP ร่วมกับ TAT peptide สามารถเสริมประสิทธิภาพในการนำส่งยีนได้ โดยเฉพาะการผสม TAT peptide ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงที่สุด (ภาพที่ 4.7 A) และมีค่าใกล้เคียงกับชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า PolyMAG และมีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่ออาศัยแรงแม่เหล็กจากภายนอกช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีน

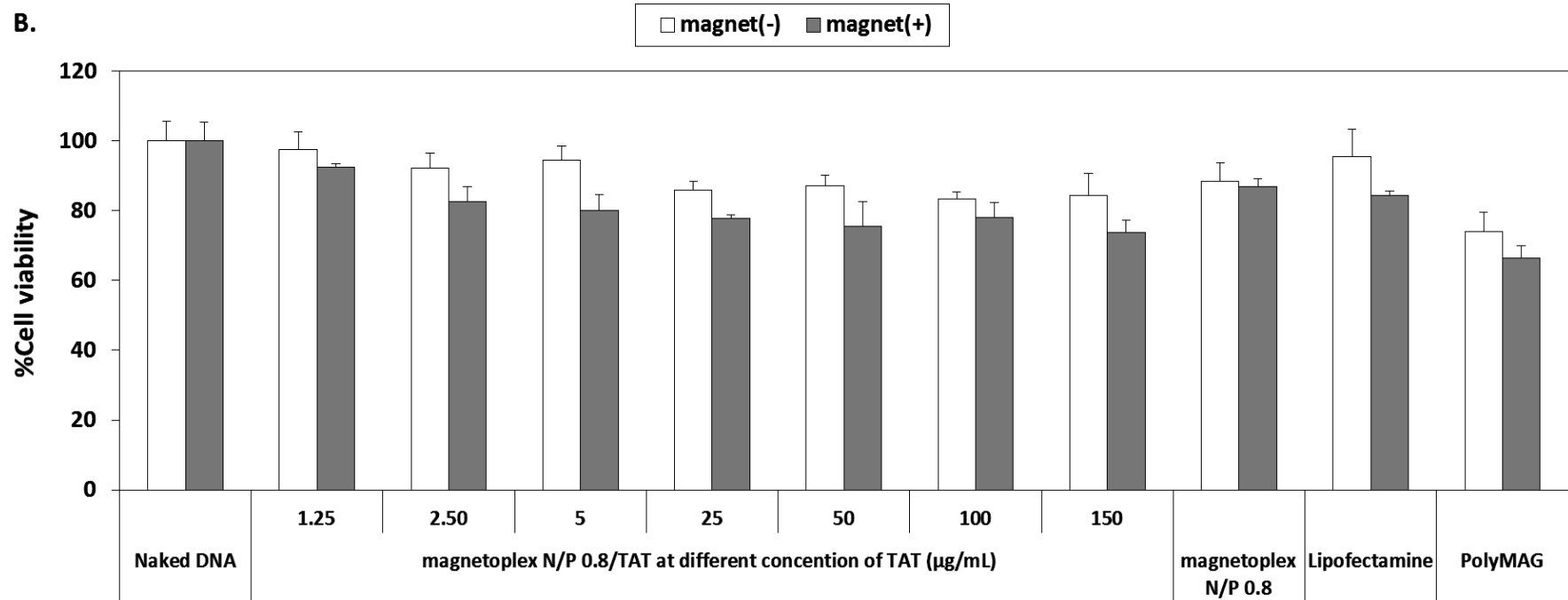
4.4.3 ผลการประเมินความเป็นพิษของ magnetoplex/TAT peptide ต่อเซลล์ LAN-5

การประเมินความเป็นพิษของ magnetoplex/TAT peptide ต่อเซลล์ LAN-5 ได้ทำการทดลองในรูปแบบเดียวกับการศึกษาประสิทธิภาพในการนำส่งยีน และตรวจสอบผลโดยใช้วิธี MTT assay เมื่อใช้ mag-PEI NP ร่วมกับ TAT peptide ในการนำส่งยีน โดยใช้ความเข้มข้น TAT ตั้งแต่ 1.25-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า magnetoplex/TAT มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ (ภาพที่ 4.7 B) เนื่องจากพบว่าเซลล์ทดสอบมีอัตราการรอดชีวิตสูงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้ TAT peptide ร่วมกับอนุภาคนาโน นั้น เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเหมาะสมในการช่วยเสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีน เนื่องจากทำให้การนำส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์มีประสิทธิภาพดีขึ้นและมีพิษต่อเซลล์ในระดับค่อนข้างต่ำ

A.



ภาพที่ 4.7 A การเสริมประสิทธิภาพของ magnetoplex /TAT peptide ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5 โดยเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000TM, PolyMAG, naked DNA และ magnetoplex กราฟแท่ง □ และ ■ แสดงการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและถูกเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนด้วย MagnetoFACTOR plate เครื่องหมาย * แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างการนำส่งยีนด้วย mag-PEI NP และ magnetoplex/TAT peptide เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้หลักการทางสถิติ Independent Samples *t*-test

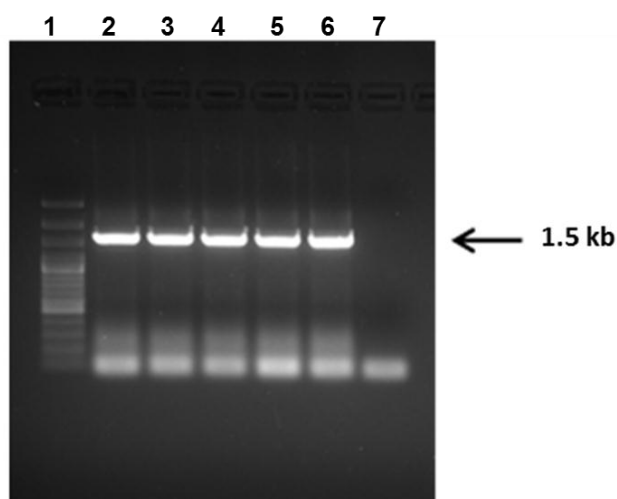


ภาพที่ 4.7 B การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ LAN-5 ของ magnetoplex /TAT peptide โดยเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000™, PolyMAG, naked DNA และ magnetoplex กราฟแท่ง □ และ ■ แสดงการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและถูกเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนด้วย MagnetoFACTOR plate เครื่องหมาย * แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างการนำส่งยีนด้วย mag-PEI NP และ magnetoplex/TAT peptide เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้หลักการทางสถิติ Independent Samples *t*-test

4.5 การนำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วย magnetoplex และ magnetoplex/TAT

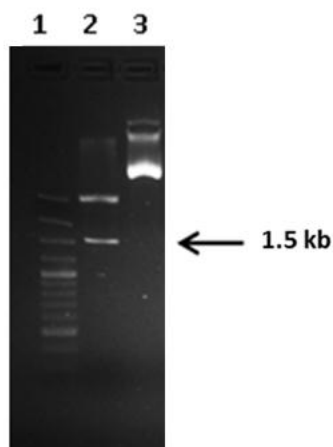
4.5.1 การโคลนยีน TPH-2 และการสร้างเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีน TPH-2 (pGL3-CMV-TPH-2)

การโคลนยีน TPH-2 เริ่มจากการสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) โดยใช้ medulla oblongata total RNA (CLONTECH cDNA panels, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) ที่ได้จากเซลล์สมองมนุษย์เป็นแม่แบบแล้ว จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณยีน TPH-2 ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและสภาวะดังที่ได้กล่าวในวิธีการทดลองข้อ 3.6.1 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบเบื้องต้นโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 2% พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการจะนำไปโคลน (ภาพที่ 4.8)



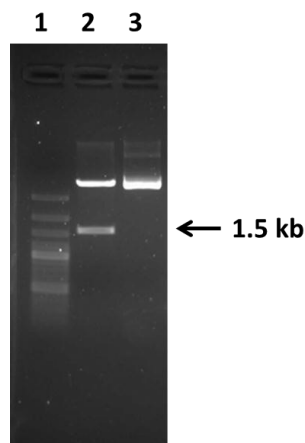
ภาพที่ 4.8 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน TPH-2 แถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder (Fermentas, MD, USA), แถวที่ 2-6 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะ และแถวที่ 7 คือ negative control

ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาตัดและแยกสกัดออกจากเจล แล้วโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM-T[®] easy vector (Promega, WI, USA) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดในแบคทีเรีย *E. coli* สกัดแยกพลาสมิดที่ได้ออกจาก *E. coli* เพื่อวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนเข้าไปด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *XbaI* และตรวจสอบผลการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 2% พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 การตรวจสอบโคลน pGEM-T[®]-TPH2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *XbaI* ลูกศรชี้ขนาดขึ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็ยีนที่ต้องการ แถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder (Fermentas, MD, USA), แถวที่ 2 คือพลาสมิด pGEM-T[®]-TPH2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *XbaI* มีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส และแถวที่ 3 คือ พลาสมิด pGEM-T[®]-TPH2 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์

จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาตัดและแยกสกัดออกจากเจล แล้วนำไปโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGL3-basic containing CMV promoter/enhancer ซึ่งเป็นพลาสมิด pGL3 basic (Promega, WI, USA) ที่มีการดัดแปลงให้มี CMV promoter/enhancer region เพื่อปรับปรุงการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์ (87) ยืนยันผลการโคลนยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *XbaI* และตรวจสอบผลการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 2% พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ดังแสดงในภาพที่ 4.10 และเมื่อตรวจสอบลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencing เปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูลพบว่าลำดับเบสของ TPH-2 ที่โคลนได้มีความเหมือนกับยีน *Homo sapiens* tryptophan hydroxylase 2 (TPH-2) mRNA 99.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) สามารถนำมาใช้ทดสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 ในการทดลองขั้นต่อไปได้



ภาพที่ 4.10 การตรวจสอบโคลน pGL3-CMV-TPH-2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Xba*I ลูกศรชี้ขนาดขั้นดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็ยีนที่ต้องการ แถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder (Fermentas, MD, USA), แถวที่ 2 คือพลาสมิด pGL3-CMV-TPH-2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Xba*I มีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส และแถวที่ 3 คือ พลาสมิด pGL3-CMV-TPH-2 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์

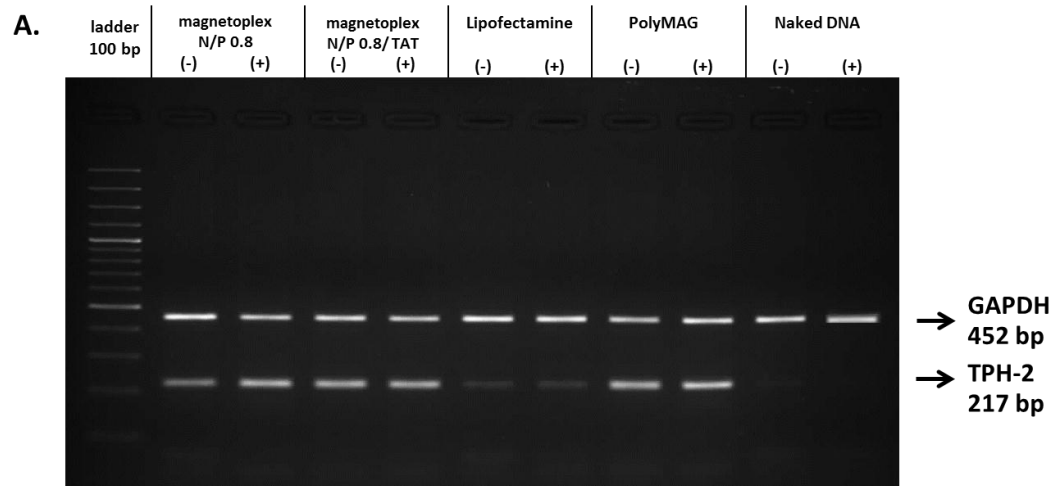
4.5.2 ผลการแสดงออกของยีน TPH-2 จากการตรวจสอบโดยเทคนิค RT-PCR

จากการประเมินประสิทธิภาพการนำส่งยีนด้วยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเครื่องหมาย luciferase พบว่า magnetoplex ที่ N/P 0.8 ให้ผลการนำส่งที่ดี อีกทั้งยังสามารถเสริมประสิทธิภาพการนำส่งได้ด้วยการเคลือบ TAT peptide ดังนั้นเพื่อยืนยันและตรวจตามประสิทธิภาพของระบบนำส่ง magnetoplex ในการนำส่งยีนบำบัด จึงได้เลือกยีน TPH-2 ซึ่งมีส่วนสำคัญในการผลิตเอนไซม์ TPH-2 ช่วยสังเคราะห์สารสื่อประสาทซีโรโทนินในระบบประสาท โดยเอนไซม์ชนิดนี้จัดว่ามีความสำคัญในขั้นกำหนดอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (rate-limiting step) การสังเคราะห์ซีโรโทนินเพื่อให้เกิดการขนส่งกระแสประสาทไปยังเซลล์ประสาทต่อไป โดยได้ทดลองนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5 ด้วยตัวพาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ magnetoplex, magnetoplex/TAT, Lipofectamine 2000™, PolyMAG และ naked DNA เหนี่ยวนำการถ่ายโอนเป็นเวลา 60 นาที เซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนเป็นเวลา 18, 24 ชั่วโมง, 3 และ 7 วันได้ถูกสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 ด้วยเทคนิค RT-PCR และอิเล็กทรอนิกส์ (ภาพที่ 4.11 A-D) ในการวิเคราะห์ผลจะวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneTools (Syngene, Cambridge, UK) เปรียบเทียบกับ housekeeping gene คือ GAPDH เพื่อแปลผลการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณ ผลการทดลองพบว่า เซลล์ในทุกช่วงเวลาหลังการถ่ายโอนยีน

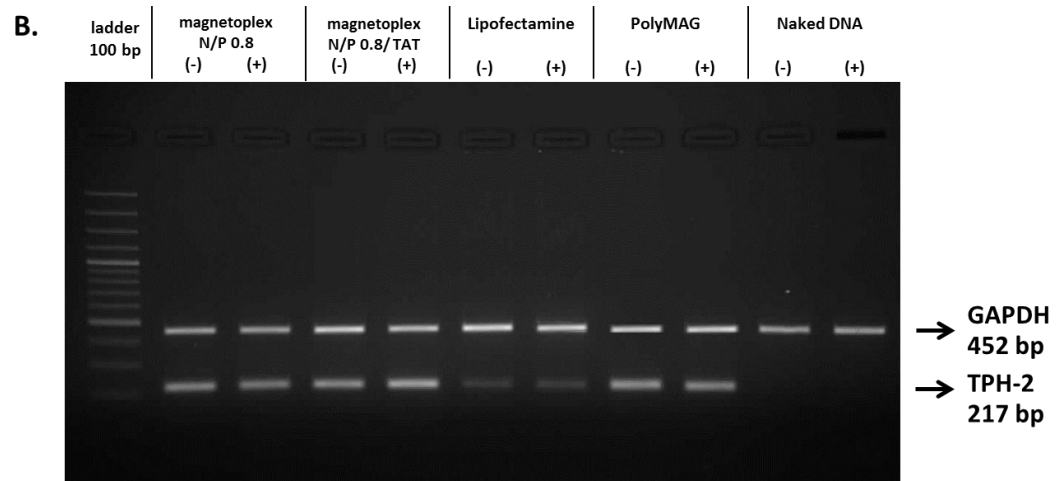
ที่ผ่านการนำส่งโดยใช้ magnetoplex, magnetoplex/TAT ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ PolyMAG เป็นตัวพา นั้น มีการแสดงออกของยีน TPH-2 เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ การนำส่งโดยใช้ naked DNA เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-Way ANOVA ตามด้วย Tukey's HSD multiple comparison test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ (ภาพที่ 4.12) โดยสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนที่ 18 ชั่วโมงภายหลังการนำส่งยีนและการแสดงออกนี้มีเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 3 จากนั้นการแสดงออกของยีนจะเริ่มลดลงในวันที่ 7 ทั้งนี้ในแต่ละช่วงเวลาให้รูปแบบของการแสดงออกการทดลองเหมือนกันทั้งการนำส่งโดยใช้แรงแม่เหล็กและปราศจากแรงแม่เหล็กช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีน ทั้งนี้ การลดระดับการแสดงออกของยีน TPH-2 อาจเป็นเพราะดีเอ็นเอที่นำส่งเข้าไปถูกย่อยด้วยเอนไซม์ enconuclease ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ชัดว่าดีเอ็นเอที่ถูกปกป้องด้วยตัวพา mag-PEI NP, mag-PEI NP/TAT prptide, Lipofectamine 2000TM และ PolyMAG จะมีการแสดงออกของยีนได้ภายหลังนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์แตกต่างจากดีเอ็นเอที่ไม่ถูกปกป้องโดยตัวพาใด เช่นกลุ่ม naked DNA ซึ่งอาจจะถูกทำลายโดยเอนไซม์ทำให้ไม่เกิดการแสดงออกของยีนหรือมีการแสดงออกได้ในระดับที่น้อยมาก สอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า การนำส่งยีนโดยใช้ naked DNA สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วภายใน 90 นาทีหลังจากมีการนำส่งยีน (93) และเมื่อใช้ microparticle หรือ nanoparticle เป็นตัวพาในการนำส่งยีนจะช่วยเพิ่มระยะเวลาการแสดงออกของยีนให้นานขึ้นมากกว่าการใช้ naked DNA ซึ่งไม่มีตัวพาช่วยปกป้องจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ (94)

ในส่วนของผลการถ่ายโอนที่ได้จากชุดนำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000TM ในช่วงเวลา 18, 24 ชั่วโมง และ 3 วัน จะมีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นแต่ไม่แตกต่างจาก naked DNA จนถึงวันที่ 7 หลังจากเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนจะมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นสูงสุดและแตกต่างจาก naked DNA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งการนำส่งโดยใช้แรงแม่เหล็กและปราศจากแรงแม่เหล็กช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีน อย่างไรก็ตาม สภาวะที่ใช้ในการถ่ายเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนเป็นเวลา 60 นาทีนั้นเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมสำหรับการถ่ายโอนยีนด้วย Lipofectamine 2000TM การทดลองนี้ใช้ Lipofectamine 2000TM เป็นชุดควบคุมเท่านั้น ผลการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ถ่ายโอนด้วย Lipofectamine 2000TM อาจมีค่าสูงกว่านี้เมื่อเหนี่ยวนำเป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

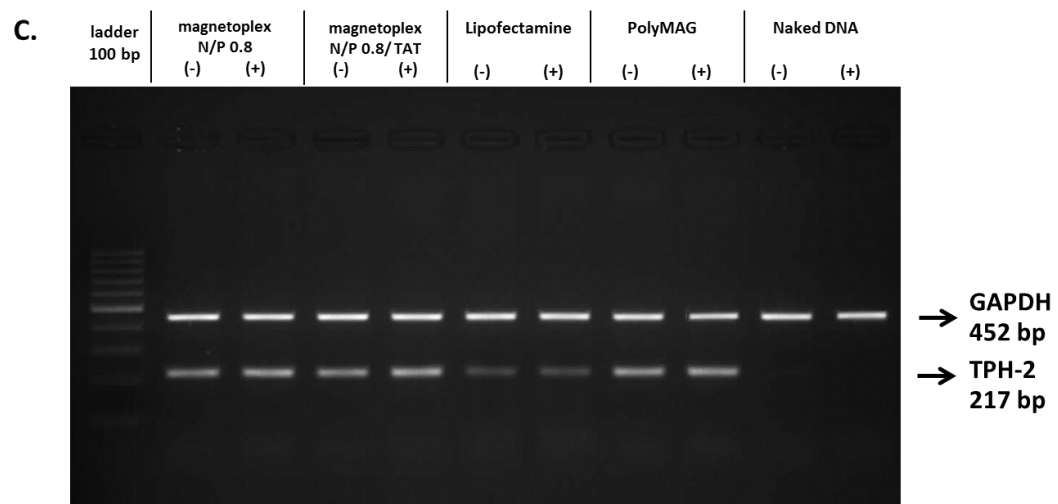
18 ชั่วโมง

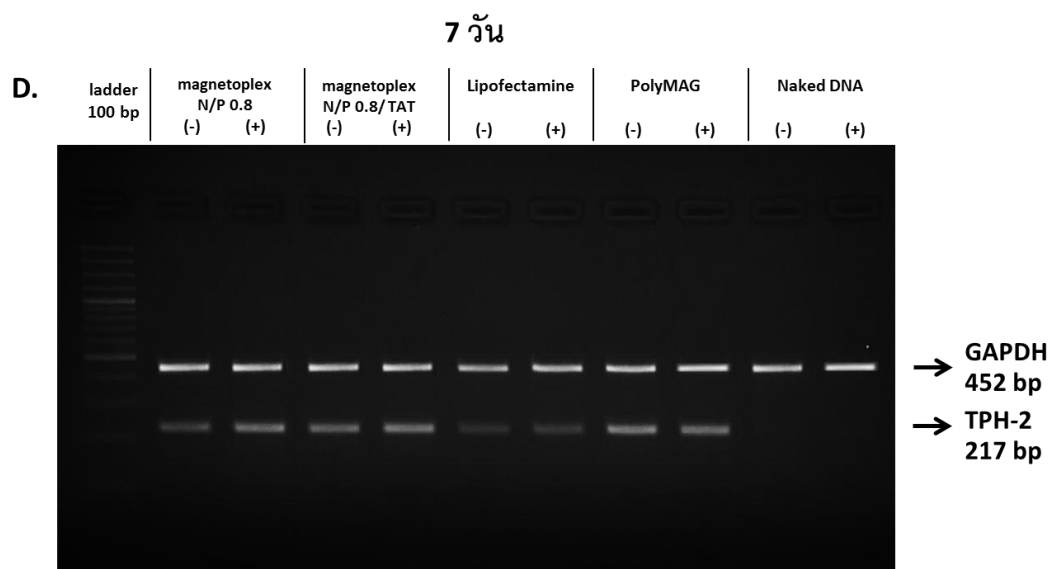


24 ชั่วโมง

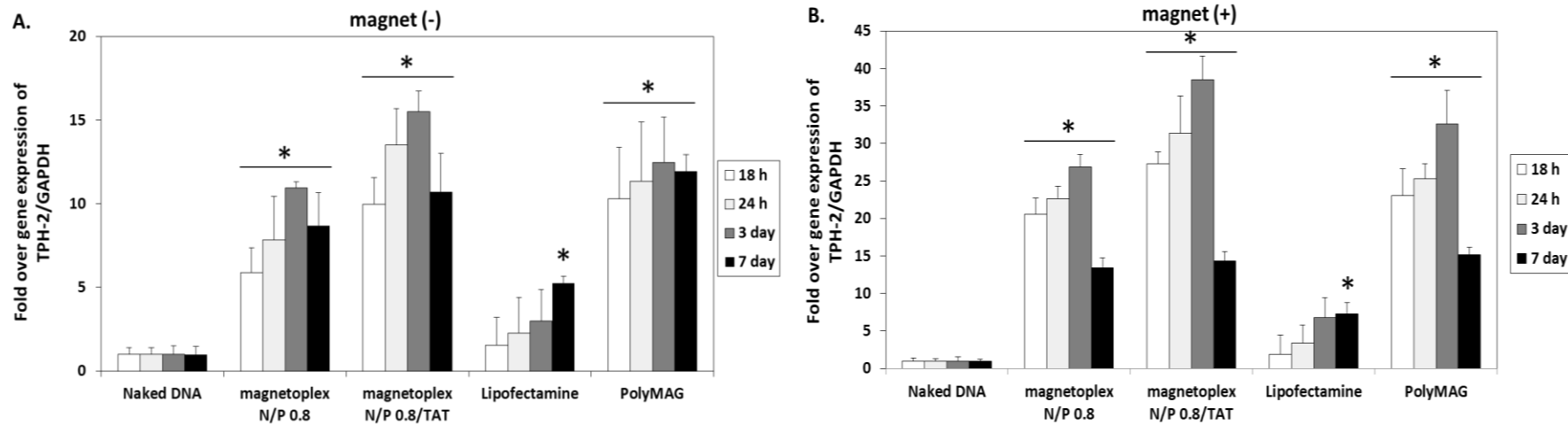


3 วัน



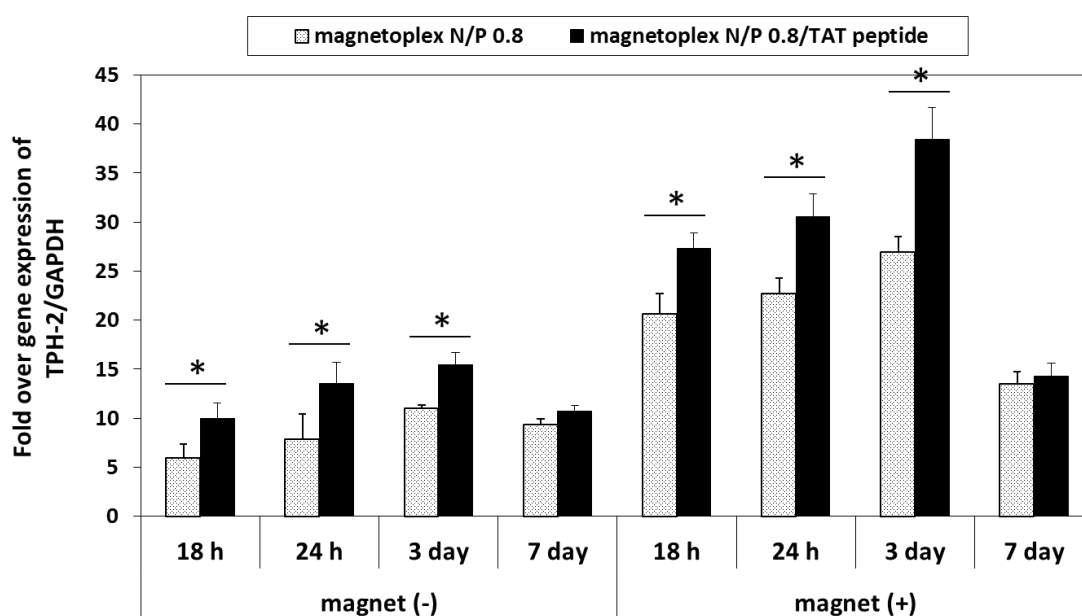


ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPH-2 และยีนควบคุม GAPDH หลังจากการถ่ายโอนยีนที่เวลา 18 ชั่วโมง (ภาพ A), 24 ชั่วโมง (ภาพ B), 3 วัน (ภาพ C) และ 7 วัน (ภาพ D) โดยใช้ตัวพาชนิดต่าง ๆ แถบดีเอ็นเอของยีน TPH-2 มีขนาด 217 เบส และยีน GAPDH มีขนาด 452 เบส เครื่องหมาย (-) คือเซลล์ไม่ถูกเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนโดยใช้แรงแม่เหล็ก และ (+) คือเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนโดยใช้แรงแม่เหล็ก



ภาพที่ 4.12 ผลแสดงออกของยีน TPH-2 เมื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยโปรแกรม GeneTools (Syngene, Cambridge, UK) เปรียบเทียบกับ housekeeping gene คือ GAPDH จากการตรวจสอบโดยเทคนิค RT-PCR ที่ช่วงเวลา 18, 24 ชั่วโมง 3 และ 7 วัน หลังจากการถ่ายโอนด้วย magnetoplex N/P 0.8, magnetoplex N/P 0.8/TAT เปรียบเทียบกับชุดน้ำยาถ่ายโอนทางการค้า Lipofectamine 2000TM, PolyMAG และ naked DNA ระดับการแสดงออกของยีนเมื่อถูกเหนี่ยวนำและไม่เหนี่ยวนำด้วย MagnetoFACTOR plate แสดงใน ภาพ A และ ภาพ B ตามลำดับ เครื่องหมาย * แสดงผลการแสดงออกของยีนที่มีความแตกต่างจาก naked DNA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้หลักการทางสถิติ One-Way ANOVA ตามด้วย Tukey's HSD multiple comparison test

จากข้อมูลการแสดงออกของยีน TPH-2 ที่ได้เมื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณแล้ว เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นชัดเจนระหว่างการใช้ตัวพา mag-PEI NP และ mag-PEI NP/TAT จึงได้แสดงกราฟเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนที่ได้จากตัวพาทั้งสองดังกล่าว (ภาพที่ 4.12) พบว่า เซลล์ LAN-5 ที่ผ่านการนำส่งยีนเป็นเวลา 18, 24 ชั่วโมง และ 3 วันโดยใช้ mag-PEI NP/TAT เป็นตัวพา จะมีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอย่างสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งในสภาวะที่มีการเหนี่ยวนำโดยแรงแม่เหล็กและปราศจากแรงแม่เหล็ก แต่ในวันที่ 7 นั้น ระดับการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันระหว่างการนำส่งโดยใช้ mag-PEI NP และ mag-PEI NP/TAT peptide เป็นตัวพา



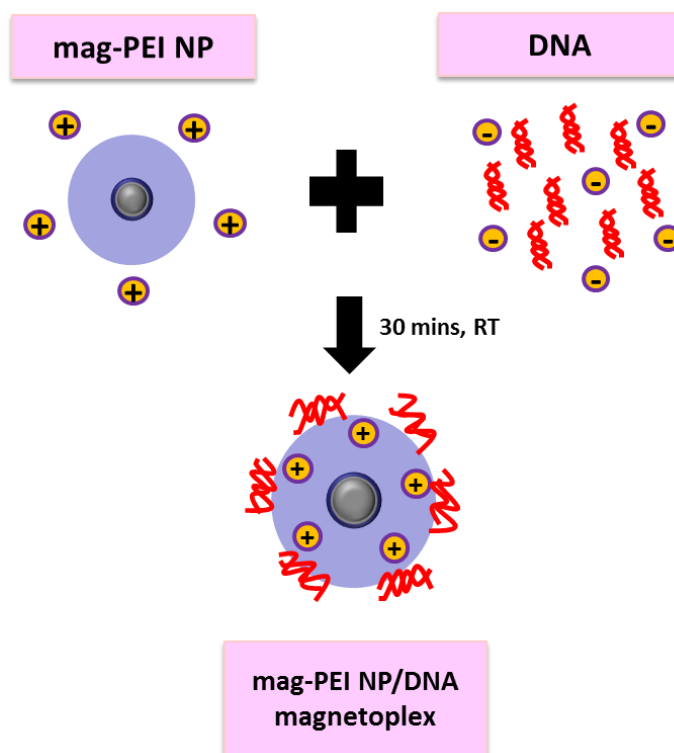
ภาพที่ 4.13 ผลแสดงออกของยีน TPH-2 จากการตรวจสอบโดยเทคนิค RT-PCR เมื่อถ่ายโอนยีนเป็นเวลา 18, 24 ชั่วโมง, 3 และ 7 วัน โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้ mag-PEI NP และ mag-PEI NP/TAT peptide เป็นตัวพา และระหว่างการนำส่งยีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำ (magnet -) และถูกเหนี่ยวนำ (magnet +) ด้วย MagnetoFACTOR plate เครื่องหมาย * แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างการนำส่งยีนด้วยตัวพา mag-PEI NP และ mag-PEI NP/TAT peptide เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้หลักการทางสถิติ Independent Samples *t*-test

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การพัฒนากระบวนการนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาเพื่อนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทให้มีประสิทธิภาพนั้นเป็นเรื่องที่ทำได้ยากและยังไม่มีเทคนิคที่ดีที่สุดในการนำส่งยีน ในการทดลองนี้จึงได้นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนหุ้มพอลิเมอร์ประจุบวกที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยคุณสมบัติของพอลิเมอร์ประจุบวกคือ PEI และอนุภาคแม่เหล็กนาโนมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 อนุภาคนี้ได้รับการสังเคราะห์ขึ้นจากศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดย Pimpha และคณะ, 2012 (4) จากการตรวจสอบด้วยกล้อง TEM พบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นมีส่วนประกอบของสารเหล็ก iron oxide กระจายอยู่ในอนุภาค อีกทั้งเมื่อทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพด้วย DNA binding assay พบว่า mag-PEI NP และดีเอ็นเอสามารถจับกันเกิดเป็น complex ที่เรียกว่า “magnetoplex” ผ่านแรงกระทำระหว่างประจุ (electrostatic interaction) โดยประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอสามารถจับกับประจุบวกของอนุภาคได้ (ภาพที่ 5.1) ซึ่งการใช้ magnetoplex ในอัตราส่วน N/P 0.8 mag-PEI NP และดีเอ็นเอจะสามารถจับกันอย่างสมบูรณ์ ทำให้ไม่มีดีเอ็นเออิสระเหลืออยู่ เมื่อนำไปทดสอบการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสจึงไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้เห็นบนเจล อีกทั้งการจับกันอย่างสมบูรณ์จะทำให้ประจุรวมของ magnetoplex มีค่าเป็นบวก จึงถูกหน่วงการเคลื่อนที่ไว้ภายใต้สนามไฟฟ้า เมื่อนำไปส่องภายใต้แสงยูวีจึงไม่ปรากฏให้เห็นแถบดีเอ็นเอบนเจล โดยสามารถเปรียบเทียบผลการทดลองได้กับแถบพลาสมิดควบคุม (control plasmid) ทั้งนี้อัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างอนุภาคตัวพาและดีเอ็นเอเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการนำส่งยีน โดยควรพิจารณาถึงรูปร่างลักษณะความยาวของสายดีเอ็นเอ และชนิดของสารพันธุกรรมที่จะนำมาใช้ในการนำส่งยีนร่วมด้วย เพื่อให้ได้อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในแต่ละสภาวะการทดลอง



ภาพที่ 5.1 ภาพจำลองแสดงการจับกันระหว่าง mag-PEI NP และดีเอ็นเอ เกิดการฟอร์มเป็น magnetoplex ด้วยแรง electrostatic interaction

จากการวัดขนาดของ mag-PEI NP และ magnetoplex พบว่า อนุภาคมีขนาด 123.8 ± 3.1 นาโนเมตร mag-PEI NP มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อจับกับพลาสมิดดีเอ็นเอเกิดเป็น magnetoplex ที่ N/P ตั้งแต่ 0.4-17.5 พบว่าขนาดของ magnetoplex ที่วัดได้ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS อยู่ในช่วง 215-370 นาโนเมตร เนื่องจากความเป็นประจุลบของดีเอ็นเอ สามารถจับกับผิวของอนุภาคซึ่งมีความเป็นประจุบวกได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ mag-PEI NP ในการจับกับดีเอ็นเอ พบว่า magnetoplex จะมีขนาดเล็กลงเนื่องจากการจับกันที่สมบูรณ์มากขึ้น ทำให้เกิดการหดแน่นของดีเอ็นเอ ทั้งนี้ อนุภาคที่มีขนาดน้อยกว่า 1 ไมโครเมตร (sub-micron) จะมีความสามารถในการเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดในระดับไมโครเมตร (95) เช่นเดียวกับผลในสัตว์ทดลองที่พบว่าอนุภาคขนาดระดับนาโนเมตรจะมีประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์มากกว่าอนุภาคที่มีขนาด 1 และ 10 ไมโครเมตรประมาณ 15-250 เท่า โดยสามารถผ่านเข้าสู่ชั้น sub-mucosal ของเซลล์ได้ โดยที่อนุภาคระดับไมโครเมตรจะผ่านเข้าถึงเพียงผิวเซลล์ชั้นนอกเท่านั้น (96) และจากการทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่าอนุภาคนาโนสามารถผ่าน blood brain barrier ที่ถูกรบกวนการทำงานในสมองได้ดีกว่าอนุภาคระดับไมโคร

อีกด้วย (97) สำหรับการวัดค่าประจุ (ζ -potential) ของอนุภาคพบว่า mag-PEI NP และ magnetoplex ที่ N/P ตั้งแต่ 0.4-17.5 มีความเป็นประจุบวก ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งซึ่งช่วยให้การนำส่งยีนมีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งการวัดค่าประจุของอนุภาคยังสะท้อนให้เห็นถึงความเสถียรทางไฟฟ้า (electrically stability) ของอนุภาคซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามอัตราส่วน N/P ที่เพิ่มมากขึ้น โดยในกระบวนการการนำส่งยีนนั้นอนุภาคที่มีความเป็นประจุบวกจะมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนดีกว่าอนุภาคประจุลบ เนื่องจากประจุบวกของอนุภาคสามารถจับกับสารพันธุกรรมที่ต้องการนำส่งและจับกับสารประจุลบบนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น proteoglycans, sialic acid และสามารถนำสารพันธุกรรมที่ต้องการนำส่งเข้าสู่เซลล์ได้ในที่สุด (98) อีกทั้ง ความเป็นประจุบวกของอนุภาคยังมีผลต่อความสามารถในการถูกปลดปล่อยออกจากเอนโดโซม เช่น การใช้อนุภาคนาโนจากพอลิเมอร์ ประจุบวก PEI ในการนำส่งยีน ทำให้ polyplex รอดพ้นจากการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในเอนโดโซม เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของ PEI ที่เรียกว่า “proton sponge effect” (99) อย่างไรก็ตามการใช้ mag-PEI NP ในปริมาณมากเกินไป จะทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของ magnetoplex ซึ่งจะไปขัดขวางการเข้าสู่เซลล์และทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนจึงลดน้อยลง อีกทั้งค่า ζ -potential ที่วัดได้จะมีความเป็นประจุบวกลดลง เนื่องจากเสียความเสถียรไป

เมื่อทำการตรวจสอบรูปร่างและลักษณะพื้นผิวโครงสร้างระดับอะตอมของ mag-PEI NP และ magnetoplex โดยกล้อง AFM พบว่า รูปร่างของอนุภาค mag-PEI NP มีลักษณะกลม มีการกระจายตัวได้ดีและเมื่อจับกับดีเอ็นเอเกิดเป็น magnetoplex จะมีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตาม การเพิ่มอัตราส่วน N/P ที่มากขึ้น เช่น ในการทดลองนี้เลือก magnetoplex N/P 4.3 ซึ่งพบว่า magnetoplex เริ่มสูญเสียความเสถียร และเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคเมื่อทดสอบภายใต้กล้อง AFM ผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับผลการวัดขนาดและค่า ζ -potential ของ magnetoplex แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีขึ้นเมื่อนำอนุภาค mag-PEI NP มาใช้ในการนำส่งยีน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอนุภาคที่มีขนาดเท่ากันนั้น พบว่า อนุภาคที่มีรูปร่างกลมจะมีประสิทธิภาพในการเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าอนุภาครูปรางแท่งถึง 500 เท่า (100)

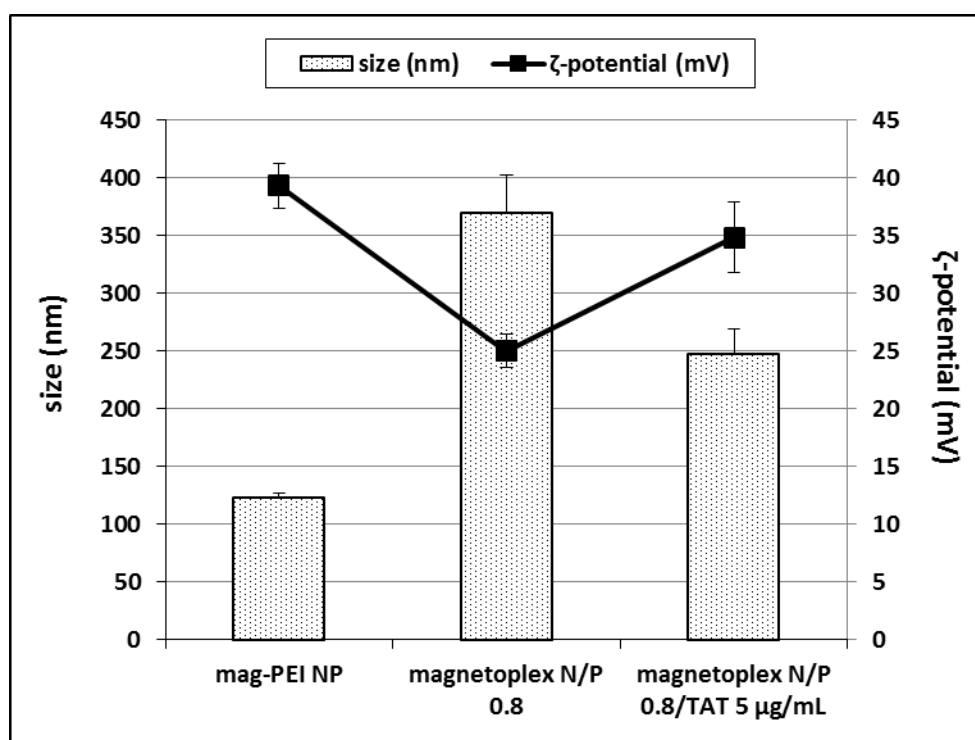
จากการประเมินประสิทธิภาพของ mag-PEI NP ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ LAN-5 พบว่า magnetoplex มีประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้แรงแม่เหล็กช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีน แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่มีส่วนประกอบของสารเหล็ก iron oxide กระจายอยู่ภายในอนุภาค จึงช่วยเร่งการตกและทำให้อนุภาคสัมผัสกับผิวเซลล์ได้รวดเร็ว เพื่อให้อนุภาคเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้ในระยะเวลาเพียง 15 นาที และเมื่อเพิ่มระยะเวลาที่

ใช้เหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนจนถึง 180 นาที พบว่าค่าสัญญาณ luciferase จะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น (time-dependent induction) เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้าที่มีการใช้ออนุภาคแม่เหล็กนาโนร่วมกับพอลิเมอร์ประจุบวก PEI เป็นตัวพาสำหรับนำส่งยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ green fluorescent proteins (GFP) เข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์เพาะเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของยีนจะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนที่เพิ่มมากขึ้น (101) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของแรงแม่เหล็กที่ช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีน โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสกับแรงแม่เหล็กจะทำให้ magnetoplex สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ รอดพ้นจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์และสามารถลดปริมาณของดีเอ็นเอที่ต้องการนำส่งได้ อนุภาค mag-PEI NP ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้คุณสมบัติของอนุภาคแม่เหล็กนาโนและพอลิเมอร์ประจุบวก PEI มารวมกันจึงมีประสิทธิภาพในการเป็นตัวพาที่ดีในการนำส่งยีน ไม่เพียงแต่การเข้าสู่เซลล์ได้ดีจะเป็นปัจจัยสำคัญในการนำส่งยีนเท่านั้นการปลดปล่อยดีเอ็นเอก็มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยีนได้เช่นกัน การเกิด “proton sponge effect” ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของ PEI สามารถช่วยปลดปล่อยดีเอ็นเอออกจากเอนโดโซมก่อนถูกทำลายจากเอนไซม์ ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนต่อไปได้ ในการทดลองนี้ magnetoplex ในอัตราส่วน N/P 0.8 มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงสุดสอดคล้องกับการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของอนุภาคที่พบว่าการจับกันอย่างสมบูรณ์ของ mag-PEI NP และดีเอ็นเอเริ่มที่ N/P 0.8 ซึ่งเป็นอัตราส่วนน้อยที่สุดที่เริ่มมีการจับกันอย่างสมบูรณ์จึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันของ magnetoplex เมื่อตรวจสอบด้วย AFM อีกทั้งผลการวัดขนาดของอนุภาคก็มีความเหมาะสมในระดับ sub-micron และมีความเป็นประจุบวกจึงทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูง ทั้งนี้ การใช้ mag-PEI NP ในปริมาณที่น้อยเกินไป (N/P < 0.8) อาจทำให้เกิดการจับกันระหว่างดีเอ็นเอและอนุภาคเกิดเป็น magnetoplex ที่ไม่สมบูรณ์ ดีเอ็นเอถูกย่อยสลายจากเอนไซม์ แต่ถ้ามีการใช้ mag-PEI NP ในปริมาณที่มากเกินไป (N/P > 0.8) magnetoplex ที่ได้จะสูญเสียความเสถียรทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคซึ่งมีขนาดหลากหลายไปขัดขวางการเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากอนุภาคสูญเสียความเสถียรไป ทำให้ความเป็นประจุบวกลดลง ความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอและการเกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์จึงมีประสิทธิภาพลดลง นอกจากนี้ การเกาะกลุ่มกันของ magnetoplex จะทำให้การแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้นได้ยากและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Cui และคณะ, 2012 (102) ซึ่งพบว่าการใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนร่วมกับ PEI สำหรับนำส่งยีน GFP เข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อไตเพาะเลี้ยงในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้อนุภาคจับกลุ่มกันเกิดเป็น complex ขนาดใหญ่

การเข้าสู่เซลล์โดยวิธีเอนโดไซโตซิสจึงมีประสิทธิภาพลดลง และมีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ประสิทธิภาพการนำส่งยีนจึงลดลงในที่สุด ดังนั้น จะเห็นได้ว่าการเลือกอัตราส่วนของ mag-PEI NP/DNA เพื่อสร้าง magnetoplex ที่เหมาะสมที่สุดในการนำส่งยีนนั้น ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยโดยต้องพิจารณาถึงคุณลักษณะทางเคมีกายภาพอื่น ๆ ร่วมด้วย นอกจากนี้ ผลการประเมินอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อใช้ magnetoplex N/P 0.8 ในการถ่ายโอนยีน พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ ซึ่งมีความเหมาะสมในการพัฒนานำมาใช้เป็นตัวพาสำหรับการนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัส

นอกจากนี้ เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยีนด้วยตัวพา mag-PEI NP ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงได้ศึกษาการเสริมประสิทธิภาพในการนำส่งยีนโดยใช้ TAT peptide ในการทดลองนี้ได้เลือก magnetoplex ที่มี N/P 0.8 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำมาทดสอบการนำส่งยีนร่วมกับการใช้ TAT peptide ผลการทดลองพบว่า magnetoplex/TAT peptide มีประสิทธิภาพการนำส่งยีนสูงเมื่อเทียบกับ magnetoplex และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ โดยเฉพาะเมื่อใช้ TAT peptide ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ magnetoplex N/P 0.8 ในการนำส่งยีน ทั้งนี้เนื่องจาก TAT peptide เป็นโปรตีนในกลุ่ม cell penetrating peptides สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนได้ นอกจากนี้ลำดับเบสบนสายเปปไทด์นั้นยังประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนซ้ำกัน 6 ตำแหน่งและไลซีน 2 ตำแหน่ง ทำให้สายเปปไทด์มีความเป็นประจุบวกสูง (74) ความเป็นประจุบวกสูงของสายเปปไทด์นี้เมื่อนำมาจับกับ magnetoplex ทำให้เกิดการจับกับดีเอ็นเอได้ดียิ่งขึ้น มีผลให้ขนาดของ magnetoplex เล็กลง เนื่องจากการจับกันขดแน่นมากขึ้นระหว่าง TAT peptide ซึ่งมีความเป็นประจุบวกสูงกับประจุลบของดีเอ็นเอที่จับอยู่กับ mag-PEI NP ด้วยหลักการ layer-by-layer coating ด้วยแรง electrostatic interaction สอดคล้องกับผลการวัดขนาดและค่าประจุของ mag-PEI NP และ magnetoplex (ภาพที่ 5.2) mag-PEI NP ที่ไม่มีการจับกับดีเอ็นเอจะมีขนาดประมาณ 123.8 ± 3.1 นาโนเมตร และวัดค่าประจุได้ 39.3 ± 1.9 มิลลิโวลต์ แต่เมื่อนำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์จะเกิดการจับกันระหว่าง mag-PEI NP และดีเอ็นเอ เกิดเป็น magnetoplex ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและค่าความเป็นประจุบวกจะลดลงเนื่องจากถูกลบล้างด้วยประจุลบจากดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเพิ่ม TAT peptide ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เข้าไปในระบบ เพื่อเสริมประสิทธิภาพในการนำส่งยีน จะทำให้ขนาดของ magnetoplex N/P 0.8 ลดลงจาก 370.0 ± 32.4 นาโนเมตร เป็น 248 ± 21.3 นาโนเมตร ทำให้การผ่านเข้าสู่เซลล์มีประสิทธิภาพมากขึ้น และเมื่อวัดค่าประจุพบว่ามีความเป็นบวกเพิ่มมากขึ้นจาก

25.0 ± 1.4 มิลลิโวลต์เป็น 32.3 ± 4.9 มิลลิโวลต์ ซึ่งช่วยเพิ่มการยึดเกาะกับประจุลบของดีเอ็นเอ และเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ TAT peptide ร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น ช่วยเสริมประสิทธิภาพในการนำส่งยีน เช่น การใช้ TAT peptide ร่วมกับไคโตซาน ในการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อปอดเพาะเลี้ยง (103) หรือการใช้ TAT peptide ร่วมกับ gold nanoparticles เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเข้าสู่นิวเคลียส (104) ดังนั้น จะเห็นได้ว่า TAT peptide สามารถช่วยเสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงเซลล์ประสาท ซึ่งมีการนำส่งยีนเข้าไปได้ยาก การใช้ TAT peptide จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัส โดยเฉพาะการนำส่งยีนเข้าสู่ระบบประสาทได้ต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 5.2 ผลการวัดขนาด (■) และค่า ζ -potential (—■) ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS เปรียบเทียบระหว่าง mag-PEI NP, magnetoplex N/P0.8 และ magnetoplex N/P 0.8/TAT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เพื่อยืนยันและตรวจตามประสิทธิภาพของระบบนำส่ง magneplex ในการนำส่งยีนบำบัด จึงได้เลือกยีน TPH-2 ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารสื่อประสาทซีโรโทนิน มาทดสอบระบบนำส่งยีนเพื่อดูประสิทธิภาพและระยะเวลาการแสดงออกของยีนภายหลังจาก

นำส่งยีน TPH-2 เข้าสู่เซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาค mag-PEI NP สามารถใช้เป็น ตัวพาแบบไม่อาศัยไวรัสในการนำส่งยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยตรวจพบการแสดงออกของยีน ได้ตั้งแต่ 18 ชั่วโมงภายหลังจากการนำส่งยีนและเพิ่มมากขึ้นจนถึงวันที่ 3 จากนั้นการแสดงออกของ ยีนจะเริ่มลดลงในวันที่ 7 เนื่องจากการดีเอ็นเอที่นำส่งถูกทำลายโดยเอนไซม์ endonuclease ภายในเซลล์ แต่มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าการนำส่งดีเอ็นเอเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้แรงแม่เหล็กช่วยเหนี่ยวนำการถ่ายโอนยีนจะทำให้ประสิทธิภาพดีขึ้น นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบการนำส่งยีนโดยใช้ magnetoplex และ magnetoplex N/P 0.8/TAT peptide ผลการทดลองพบว่าเซลล์ LAN-5 ที่ถูกนำส่งยีนโดยใช้ magnetoplex N/P 0.8/TAT peptide มีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นสอดคล้องกับผลการประเมินประสิทธิภาพการนำส่ง ยีนโดยใช้ luciferase assay แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ TAT peptide ที่สามารถช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพในการนำยีน ซึ่งเป็นเป็นผลมาจากปัจจัยด้านกายภาพต่าง ๆ ทั้งในเรื่องขนาดของ magnetoplex ที่เล็กลงและความเป็นประจุบวกที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้การนำส่งยีนเกิดขึ้นได้อย่างมี ประสิทธิภาพ การแสดงออกของยีนจึงเพิ่มขึ้นสูงตามไปด้วย

การพัฒนาระบบนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเป็น ตัวพา โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโน mag-PEI NP สามารถเพิ่มประสิทธิภาพเป็นตัวพาสำหรับนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ประสาทเฉพาะได้ เป็นอย่างดี มีต้นทุนในการผลิตต่ำ อีกทั้งปัจจัยด้านเคมีกายภาพของอนุภาคมีความเหมาะสม สามารถจับกับดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อใช้อัตราส่วนที่เหมาะสม อนุภาคมีขนาดในระดับ sub-micron มีความเป็นประจุบวกสูง ช่วยในการจับกับดีเอ็นเอและเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การเข้าสู่ เซลล์เกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ เหมาะสำหรับการนำมาใช้เป็น ตัวพานำส่งยีน อย่างไรก็ตาม การพัฒนาอนุภาค mag-PEI NP สำหรับใช้เป็นตัวพานำส่งยีนเข้าสู่ เซลล์ชนิดอื่นหรือการนำส่งโดยใช้สารพันธุกรรมในรูปแบบที่แตกต่างออกไป ควรทำการทดสอบ สภาวะทดลองให้เหมาะสมสำหรับการทดลองในแต่ละรูปแบบ เพื่อประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการ นำส่งยีน นอกจากนี้ ในงานวิจัยได้ทดสอบการเสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีนโดยใช้ TAT peptide ผลการทดลองพบว่า มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ TAT peptide ช่วยในการนำส่ง ยีน อีกทั้งสามารถนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ให้มีการแสดงออกของยีนได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 18 ชั่วโมงภายหลังจากการนำส่งยีนและทำให้มีการแสดงออกของยีนในระยะเวลานาน ไม่ต้องการ นำส่งยีนเข้าไปบ่อยครั้ง ซึ่งการพัฒนาระบบนำส่งยีนในครั้งนี้เป็นผลดีในการนำมาประยุกต์ใช้ในการ รักษาโรคโดยใช้ยีนบำบัดต่อไปได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามควรมีการพัฒนางานวิจัยทางด้านนี้ ใน *in vivo* เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพเมื่อนำส่งสู่ระบบร่างกายอย่างแท้จริงต่อไป

รายการอ้างอิง

- (1) Niidome, T., and Huang, L. Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors. *Gene Therapy*. 9 (2002) : 1647-1652.
- (2) Zhang, X., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*. 305 (2004) : 217.
- (3) Hasegawa, H., and Nakamura, K. Tryptophan Hydroxylase and Serotonin Synthesis Regulation *Handbook of Behavioral Neuroscience*. 21 (2010) : 183-202.
- (4) Pimpha, N., Chaleawler-Umpon, S., and Sunintaboon, P. Core/shell polymethyl methacrylate/polyethyleneimine particles incorporating large amounts of iron oxide nanoparticles prepared by emulsifier-free emulsion polymerization. *Polymer*. 53 (2010) : 2015-2022.
- (5) Hua, M.Y., Liu, H.L., Yang, H.W., Chen, P.Y., Tsai, R.Y., Huang, C.Y., et al. The effectiveness of a magnetic nanoparticle-based delivery system for BCNU in the treatment of gliomas. *Biomaterials*. 32 (2011) : 516-527.
- (6) Position paper on social, ethical and public awareness issues in gene therapy. *European society of gene therapy*. (2002).
- (7) Lu, X., Yu, Q., Binder, G.K., Chen, Z., Slepishkina, T., Rossi, J., et al. Antisense-mediated inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by use of an HIV type 1-based vector results in severely attenuated mutants incapable of developing resistance. *Journal of Virology*. 78 (2004) : 7079-7088.
- (8) Jonson, A.L., Rogers, L.M., Ramakrishnan, S., and Downs, L.S. Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 111 (2008) : 356-364.
- (9) Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 270 (1995) : 475-480.
- (10) Chuah, M., Collen, D., and VandenDriessche, T. Biosafety of adenoviral vectors. *Current Gene Therapy*. 3 (2003) : 527-543.

- (11) Gallo-Penn, A.M., Shirley, P.S., Andrews, J.L., Tinlin, S., Webster, S., Cameron, C., et al. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood*. 97 (2001) : 107-113.
- (12) Schenborn, E.T., and Goiffon, V. DEAE-Dextran Transfection of Mammalian Cultured Cells. *Methods in Molecular Biology*. 130 (2000) : 147-153.
- (13) Graham, F.L., and Van der Eb, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52 (1973) : 456-467.
- (14) Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 84 (1987) : 7413-7417.
- (15) Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., and Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Control Release*. 114 (2006) : 100-109.
- (16) Navarro, G., and Ilarduya, C.T. Activated and non-activated PAMAM dendrimers for gene delivery in vitro and in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 5 (2009) : 287-297.
- (17) Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., and Göpferich, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 60 (2005): 247-266.
- (18) Cho, Y., Shi, R., and Borgens, R.B. Chitosan nanoparticle-based neuronal membrane sealing and neuroprotection following acrolein-induced cell injury. *Journal of Biological Engineering*. 4 (2010).
- (19) Chen, C., and Okayama, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology*. 7 (1987) : 2745-2752.
- (20) Karmali, P.P., and Chaudhuri, A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved Issues, open Questions, and future promises. *Medical Research Reviews*. 27 (2007) : 696-722.
- (21) Lopata, M.A., Cleveland, D.W., and Sollner-Webb, B. High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Research*. 12 (1984) : 5707-5717.

- (22) Capecchi, M.R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 22 (1980) : 479-488.
- (23) Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*. 327 (1987) : 70-73.
- (24) Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., and McCabe, D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 87 (1990) : 9568-9572.
- (25) Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*. 1 (1982) : 841-845.
- (26) Mah, C., Fraites, T.J., Zolotukhin, I., Song, S., Flotte, T.R., and Dobson, J. Improved method of recombinant AAV2 delivery for systemic targeted gene therapy. *Molecular Therapy*. 6 (2002) : 106-112.
- (27) Plank, C., Scherer, F., Schillinger, U., Anton, M., and Bergemann, C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force. *European Cells and Materials Journal*. 3 (2002) : 79-80.
- (28) Schillinger, U., Brill, T., Rudolph, C., Huth, S., Gersting, S., Krötz, F., et al. Advances in magnetofection magnetically guided nucleic acid delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 293 (2005) : 501-508.
- (29) Namgung, R., Singha, K., Yu, M.K., Jon, S., Kim, Y.S., Ahn, Y., et al. Hybrid superparamagnetic iron oxide nanoparticle-branched polyethylenimine magnetoplexes for gene transfection of vascular endothelial cells. *Biomaterials*. 31 (2010) : 4204-4213.
- (30) Pan, X., Guanb, J., Yood, J.W., Epsteind, A.J., Lee, L.J., and Lee, R.J. Cationic lipid-coated magnetic nanoparticles associated with transferrin for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 358 (2008) : 263-270.
- (31) Al-Deen, F.N., Ho, J., Selomulya, C., Ma, C., and Coppel, R. Superparamagnetic nanoparticles for effective delivery of malaria DNA vaccine. *Langmuir*. 27 (2011) : 3703-3712.
- (32) Zhang, C., Yadava, P., and Hughes, J. Polyethylenimine strategies for plasmid delivery to brain-derived cells. *Methods*. 33 (2004) : 144-150.

- (33) Southwell, A.L., Ko, J., and Patterson, P.H. Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*. 29 (2009) : 13589-13602.
- (34) Summerford, C., and Samulski, R.J. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of Virology*. 72 (1998) : 1438-1445.
- (35) Björklund, A., Kirik, D., Rosenblad, C., Georgievska, B., Lundberg, C., and Mandel, R.J. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Research*. 886 (2000): 82-98.
- (36) Janson, C., McPhee, S., Haselgrove, J., Freese, A., Wang, D.J., Shera, D., et al. Clinical protocol. Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. *Human Gene Therapy*. 13 (2002) : 1391-1412.
- (37) Paterna, J.C., and Büeler, H. Recombinant adeno-associated virus vector design and gene expression in the mammalian brain. *Methods*. 28 (2002): 208-218.
- (38) Hartigan-O'Connor, D., Barjot, C., Salvatori, G., and Chamberlain, J.S. Generation and growth of gutted adenoviral vectors. *Methods in Enzymology*. 346 (2002): 224-246.
- (39) Todo, T. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. *Frontiers Bioscience*. 13 (2008) : 2060-2064.
- (40) Déglon, N., and Hantraye, P. Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *Journal of Gene Medicine*. 7 (2005) : 530-539.
- (41) Blesch, A., Lu, P., and Tuszynski, M.H. Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair. *Brain Research Bulletin*. 57 (2002) : 833-838.
- (42) Brooks, A.I., Stein, C.S., Hughes, S.M., Heth, J., McCray, P.M., Jr., et al. Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99 (2002) : 6216-6221.

- (43) Bianco, C.L., Ridet, J.L., Schneider, B.L., Déglon, N., and Aebischer, P. α -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99 (2002) : 10813-10818.
- (44) Davidson, B.L., and Breakefield, X.O. Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Neuroscience*. 4 (2003) : 353-364.
- (45) Sonawane, N.D., Szoka, F.C., Jr., and Verkman, A.S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) : 44826-44831.
- (46) Wang, X., Wang, C., Zeng, J., Xu, X., Hwang, P.Y., Yee, W.C., et al. Gene transfer to dorsal root ganglia by intrathecal injection: effects on regeneration of peripheral nerves. *Molecular Therapy*. 12 (2005) : 314-320.
- (47) Zhang, Y., Schlachetzki, F., Zhang, Y.F., Boado, R.J., and Pardridge, W.M. Normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism with intravenous nonviral gene therapy and a brain-specific promoter. *Human Gene Therapy*. 15 (2004) : 339-350.
- (48) Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Ciccarone, V.C., and Price, P.J. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *Journal of Neuroscience Methods*. 112 (2001) : 95-99.
- (49) Ma, N., Wu, S.S., Ma, Y.X., Wang, X., Zeng, J., Tong, G., et al. Nerve growth factor receptor-mediated gene transfer. *Molecular Therapy*. 9 (2004) : 270-281.
- (50) Kwon, E.J., Lasiene, J., Jacobson, B.E., Park, I.K., Horner, P.J., and Pun, S.H. Targeted nonviral delivery vehicles to neural progenitor cells in the mouse subventricular zone. *Biomaterials*. 8 (2010) : 2417-2724.
- (51) Errico, C., Gazzarri, M., and Chiellini, F. A novel method for the preparation of retinoic acid-loaded nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 5 (2009) : 2336-2347.
- (52) Malhotra, M., Lane, C., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., and Prakash, S. A novel method for synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and in vitro analysis. *International Journal of Nanomedicine*. 6 (2011) : 485-494.

- (53) Choi, B.H., Ha, Y., Ahn, C.H., Huang, X., Kim, J.M., Park, S.R., et al. A hypoxia-inducible gene expression system using erythropoietin 3' untranslated region for the gene therapy of rat spinal cord injury. *Neuroscience Letters*. 412 (2007) : 118-122.
- (54) MicroPorator cell database [Online]. Available from: www.microporator.com [2011,Nov 3].
- (55) Ghosh, C., Song, W., and Lahiri, D.K. Efficient DNA transfection in neuronal and astrocytic cell lines. *Molecular Biology Reports*. 27 (2000) : 113-121.
- (56) Tinsley, R.B., Vesey, M.J., Barati, S., Rush, R.A., and Ferguson, I.A. Improved non-viral transfection of glial and adult neural stem cell lines and of primary astrocytes by combining agents with complementary modes of action. *Journal of Gene Medicine*. 6 (2004) : 1023-1032.
- (57) Spitzenberg, V., and Grün, M. Efficient transfection of neuroblastoma cell line using FuGENE[®] HD transfection reagent. *Biochemica*. 1 (2007) : 11-12.
- (58) Bergen, J.M., Park, I.K., Homer, P.J., and Pun, S.H. Nonviral Approaches for Neuronal Delivery of Nucleic Acids. *Pharmaceutical Research*. 25 (2008) : 983-998.
- (59) Yang, S., and May, S. Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: A theoretical investigation of the proton sponge hypothesis. *Journal of Chemical Physics*. 129 (2008) : 185105.
- (60) Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*. 8 (2009) : 543-557.
- (61) Mao S, Sun W, and Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62 (2010) : 12-27.
- (62) Kopatz, I., Remy, J.S., and Behr, J.P. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *Journal of Gene Medicine*. 6 (2004) : 769-776.
- (63) Kaplan, I.M., Wadia, J.S., and Dowdy, S.F. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of Control Release*. 102 (2005) : 247-253.
- (64) Conner, S.D., and Schmid, S.L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422 (2003) : 37-44.

- (65) Bausinger, R., von Gersdorff, K., Braeckmans, K., Ogris, M., Wagner, E., Brauchle, C., et al. The transport of nanosized gene carriers unraveled by live-cell imaging. *Angewandte Chemie International Edition*. 45 (2006) : 1568-1572.
- (66) Vaughan, E.E., and Dean, D.A. Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Molecular Therapy*. 13 (2006) : 422-428.
- (67) Mesika, A., Kiss, V., Brumfeld, V., Ghosh, G., and Reich, Z. Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein. *Human Gene Therapy*. 16 (2005) : 200-208.
- (68) Vaughan, E.E., DeGiulio, J.V., and Dean, D.A. Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: Mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Current Gene Therapy*. 6 (2006) : 671-681.
- (69) Mann, A., Thakur, G., Shukla, V., and Ganguli, M. Peptides in DNA delivery: current insights and future directions. *Drug Discovery Today*. 13 (2008) : 152-160.
- (70) Rudolph, C., Plank, C., Lausier, J., Schillinger, U., Müller, R.H., and Rosenecker, J. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) : 11411-11418.
- (71) Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269 (1994) : 10444-10450.
- (72) Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T., and Langel, Ü. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Experimental Cell Research*. 269 (2001) : 237-244.
- (73) Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., et al. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1414 (1998) : 127-139.
- (74) Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Research*. 25 (1997) : 2730-2736.

- (75) Sabatier, J.M., Vives, E., Mabrouk, K., Benjouad, A., Rochat, H., Duval, A., et al. Evidence for Neurotoxic Activity of tat from Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*. 65 (1991) : 961-967.
- (76) Trabulo, S., Cardoso, A.L., Mano, M., and Lima, M.C. Cell-penetrating peptides—Mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals*. 3 (2010) : 961-993.
- (77) Brooks, H., Lebleu, B., and Vivès, E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (2005) : 559-577.
- (78) Wong, S.Y., Pelet, J.M., and Putnam, D. Polymer systems for gene delivery—Past, present, and future. *Progress in Polymer Science*. 32 (2007) : 799-837.
- (79) Walther, D.J., and Bader, M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*. 66 (2003) : 1673-1680.
- (80) Neumeister, A. Tryptophan depletion, serotonin, and depression: where do we stand ?. *Psychopharmacology Bulletin*. 37 (2003) : 99-115.
- (81) Haghghi, F., Bach-Mizrachi, H., Huang, Y.Y., Arango, V., Shi, S., Dwork, A.J., et al. Genetic architecture of the human tryptophan hydroxylase 2 Gene: existence of neural isoforms and relevance for major depression Novel TPH2 gene variant associated with major depression. *Molecular Psychiatry*. 13 (2008) : 813-820.
- (82) Tsai, S.J., Hong, C.J., Liou, Y.J., Yu, Y.W., Chen, T.J., Hou, S.J., et al. Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with major depression and antidepressant treatment response. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 33 (2009) : 637-641.
- (83) Roche, S., and McKeon, P. Support for tryptophan hydroxylase-2 as a susceptibility gene for bipolar affective disorder. *Psychiatric Genetics*. 19 (2009): 142-146.
- (84) Lin, Y.M., Chao, S.C., Chen, T.M., Lai, T.J., and Chen, J.S. Association of functional polymorphisms of the human Tryptophan Hydroxylase 2 gene with risk for bipolar disorder in Han Chinese. *Archives of General Psychiatry*. 64 (2007) : 1015-1024.
- (85) Lopez, V.A., Detera-Wadleigh, S., Cardona, I., Kassem, L., and McMahon, F.J. Nested association between genetic variation in tryptophan hydroxylase 2, bipolar affective disorder, and suicide attempts. *Biological Psychiatry*. 61 (2007): 181-186.

- (86) Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., and et al. The indolealkylamine 5-hydroxytryptamine, serotonin, was identified initially because of interest in its cardiovascular effects. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* 6th edition 1999.
- (87) Tencomnao, T., Rakkhitawatthana, V., and Sukhontasing, K. Evaluation of a novel luciferase reporter construct: A positive control plasmid for reporter gene assay. *African Journal of Biotechnology*. 7 (2008) : 2124-2127.
- (88) Bradford assay [Online]. Available from: <http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm> [June 5, 2012].
- (89) Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns [Online]. Available from: <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/LSR/PDP/> [2011, Feb 12].
- (90) Divya, C.S., and Pillai, M.R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*. 45 (2006) : 320-332.
- (91) Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A.S., and Stroeve, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 336 (2009) : 510-518.
- (92) Hao, Y., Zhang, M., He, J., and Ni, P. Magnetic DNA Vector Constructed from PDMAEMA Polycation and PEGylated Brush-Type Polyanion with Cross-Linkable Shell. *Langmuir*. 28 (2012) : 6448-6460.
- (93) Barry, M.E., Pinto-González, D., Orson, F.M., McKenzie, G.J., Petry, G.R., and Barry, M.A. Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Human Gene Therapy*. 10 (1999) : 2461-2480.
- (94) Berg, J.H., and Haanen, J. Gene therapy with naked DNA: Potential steps towards deregulation [Online]. Available from: www.cogem.net [2012, Jul 16].
- (95) Panyam, J., and Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55 (2003) : 329-347.

- (96) Desai, M.P., Labhassetwar, V., Amidon, G.L., and Levy, R.J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharmaceutical Research*. 13 (1996) : 1838-1845.
- (97) Kroll, R., Pagel, M., Muldoon, L., Roman-Goldstein, S., Fiamengo, S., and Neuwelt, E. Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: A comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery*. 43 (1998) : 879-886.
- (98) Verma, A., and Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle - Cell Interactions. *Nanomaterial - cell interactions*. 6 (2010) : 12-21.
- (99) Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A.M., and Langer, R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *Journal of Gene Medicine*. 7 (2005) : 657-663.
- (100) Jiang, W., Kim, B.Y., Rutka, J.T., and Chan, W.C.W. Size selective mechanism governs engineered nanoparticle-induced membrane receptor trafficking. *Nature Nanotechnology*. 3 (2008) : 145.
- (101) Kami, D., Takeda, S., Itakura, Y., Gojo, S., Watanabe, M., and Toyoda, M. Application of Magnetic Nanoparticles to Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. 12 (2011) : 3705-3722.
- (102) Cui, J., Cui, H., Wang, Y., Sun, C., Li, K., Ren, H., et al. Application of PEI-Modified Magnetic Nanoparticles as Gene Transfer Vector for the Genetic Modification of Animals. *Advances in Materials Science and Engineering*. (2012).
- (103) Katas, H., Dzulkefli, N.N.S.N., and Sahudin, S. Synthesis of a new potential conjugated TAT-peptide-Chitosan nanoparticles carrier via disulphide linkage. *Journal of Nanomaterials*. (2012) : 1-7.
- (104) Fuente, J.M., and Berry, C.C. Tat Peptide as an Efficient Molecule To Translocate Gold Nanoparticles into the Cell Nucleus. *Bioconjugate Chemistry*. 16 (2005): 1176-1180.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียม LB broth (1 ลิตร)

Bacto-tryptone	10	กรัม
Bacto-yeast extracts	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

2. การเตรียม DEPC-treated water

ประกอบด้วย 0.01% Diethylpyrocarbonate (DEPC)

ผสมกับน้ำในภาชนะที่ปราศจาก RNase

ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนและนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave)

3. การเตรียม 10% DMEM with glucose (50 มิลลิลิตร)

DMEM	45	มิลลิลิตร
Fetal Bovine Serum	5	มิลลิลิตร
Antibiotic - Antimycotic	500	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียม Tris-acetate Buffer (TAE) (50X)

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ EDTA, pH 8	100	มิลลิลิตร

เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

5. การเตรียมอะกาโรสเจล 2% (100 มิลลิลิตร)

ชั่งผงอะกาโรส 2 กรัมแล้วเติม 1X TAE buffer จนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าไมโครเวฟจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงแม่พิมพ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยการแช่ไว้ใน 1X TAE buffer

ภาคผนวก ข

ลำดับเบสของยีน TPH-2 ที่ได้จากการโคลนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยวิธี DNA sequencing พบว่าลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอมีความเหมือนกับยีน *Homo sapiens* tryptophan hydroxylase 2 (TPH-2) mRNA 99.5 เปอร์เซ็นต์ อ้างอิงจากลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank accession No. NM_173353

CCCCCGGCG	CTTGCCTACT	GGCCCCTCTA	GTACCCCCTT	GCTGCAGAGA
AAGAATATTA	CACCGGGATC	CATGCAGTCA	GCAATGATGA	TGTTTTCCAG
TAAATACTGG	GCACGGAGAG	GGTTTTCCCT	GGATTCAGCA	GTGCCCGAAG
AGCATCAGCT	ACTTGGCAGC	TCAACACTAA	ATAAACCTAA	CTCTGGCAAA
AATGACGACA	AAGGCAACAA	GGGAAGCAGC	AAACGTGAAG	CTGCTACCGA
AAGTGGCAAG	ACAGCAGTTG	TTTTCTCCTT	GAAGAATGAA	GTTGGTGGAT
TGGTAAAAGC	ACTGAGGCTC	TTTCAGGAAA	AACGTGTCAA	CATGGTTCAT
ATTGAATCCA	GGAAATCTCG	GCGAAGAAGT	TCTGAGGTTG	AAATCTTTGT
GGACTGTGAG	TGTGGGAAAA	CAGAATTCAA	TGAGCTCATT	CAGTTGCTGA
AATTCAAAC	CACTATTGTG	ACGCTGAATC	CTCCAGAGAA	CATTTGGACA
GAGGAAGAAG	AGCTAGAGGA	TGTGCCCTGG	TTCCCTCGGA	AGATCTCTGA
GTTAGACAAA	TGCTCTCACA	GAGTTCTCAT	GTATGGTTCT	GAGCTTGATG
CTGACCACCC	AGGATTTAAG	GACAATGTCT	ATCGACAGAG	AAGAAAGTAT
TTTGTGGATG	TGGCCATGGG	TTATAAATAT	GGTCAGCCCA	TTCCCAGGGT
GGAGTATACT	GAAGAAGAAA	CTAAAACTTG	GGGTGTTGTA	TTCCGGGAGC
TCTCCAAACT	CTATCCCCT	CATGCTTGCC	GAGAGTATTT	GAAAACTTC
CCTCTGCTGA	CTAAATACTG	TGGCTACAGA	GAGGACAATG	TGCCTCAACT
CGAAGATGTC	TCCATGTTTC	TGAAAGAAAG	GTCTGGCTTC	ACGGTGAGGC
CGGTGGCTGG	ATACCTGAGC	CCACGAGACT	TTCTGGTAGG	ACTGGCCTAC
AAAGTGT				

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเกวลิน คลังทอง เกิดเมื่อวันที่ 29 มิถุนายน พ.ศ.2531 ณ โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศไโสมิกส์-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยี คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ International Journal of Nanomedicine หัวข้อเรื่อง “Acceleration of gene transfection efficiency in neuroblastoma cells through polyethyleneimine/poly(methyl methacrylate) core-shell magnetic nanoparticles”