บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

-20 °C Freezer	SANYO
-80 °C Freezer	IlShin Lab Co.,Ltd
96 Well Cell Culture Cluster Flat Bottom with Lid	Corning Incorporation
Absorbance photometer	Anthos
Analytical balances	METTLER TOLEDO
Block heater	Wealtec Corp.
Barrier tips (20,100,1000 µl)	CLP
Blender	Philips
Camera hood และ control unit	UVItec
Cell culture dish (60 mm x 15 mm, 100 mm x 20 mm)	Corning Incorporation
Cell Culture insert 8.0 µm pore size PET track-etched membrane	Becton Dickinson Labware
Centrifuge tube (15, 50 ml)	BioLogix Research Company
CO_2 Incubator	Sheldon Manufacturing Inc
Companion plate, 24 well with low evaporation lid	Becton Dickinson Labware
Cryocentrifuge	Kendro Laboratory Products
Cryovial tube (2 ml)	Simport plastics
Disposable serological pipette (5, 10 ml)	Corning Incorporation
Glassware	Pyrex
Hand tally counter	Eastern Pioneer Sale and Service
Hemacytometer counting chamber	HBG

Inverted microscope	Olympus
Laminar flow cabinet	FLUFRANCE
Light microscope	Olympus
Liquid nitrogen refrigerator	TAYLOR-WHARTON
Micro high speed refrigerated centrifuge	Vision Scientific Co., Ltd
Microbiological safety cabinet	Thermo Electron Corporation
Microcentrifuge tube (0.2, 0.5, 1.5 ml)	Molecular BioProducts
Microscope slide (25.4 x 76.2 mm)	Sail brand
Membrane filter (pore size 2μm)	Gelmanscinces
Pipettes	GILSON
Pipet aids	Jencons (scientific) LTD
Pipette tips (10, 200, 1000 μl)	Sorenson BioScience, Inc.
Power supply	Biorad
Qualitative filter papers	Whatman Limited
Rotary evaporators	Heidolph Instruments
Semi-automated benchtop chemistry photometer	Chem-Labs Limited
Sterile syringes filter	Corning Incorporation
Submarine/Horizontal gel electrophoresis system	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Thermal cycler	ThermoHybrid
Ultraviolet_visible spectrophotometer	Shimadzu
Ultraviolet transilluminator	UVItec Limited
Vacuum regulator	SHAF®
Video copy processor	Mitsubishi
Vortex mixer	FINEPCR
Water bath	Memmert

3.1.2 น้ำยาและสารเคมี

100 bp DNA Ladder	New England BioLabs
100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Fermentas
Absolute ethanol	Merck
Agarose gel	ISC BioExpress
β–actin primers	Invitrogen
Boric acid	VWR international Ltd
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega corporation
Chloroform	Merck
Curcumin, ≥95.0% (TLC)	Fluka
Deoxyribonuclease I, Amplification grade	Invitrogen
Diethylpyrocarbonate	Amesco
Dimethyl sulfoxide, ≥ 99.5% (GC)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	HyClone
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10X)	JRH Biosciences
Eosin solution	C.V. Laboratories co., LTD
Ethylenediaminetetraacetic acid	VWR international Ltd
Ethidium bromide	Sigma
Fetal bovine serum	HyClone
Fungizone Amphotericin B	Invitrogen
GAPDH primers	Invitrogen
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	Promega corporation
Isopropanol	Sigma
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	Becton Dickinson Labware
Methanol	Merck
Modified Haematoxylin solution	C.V. Laboratories co., LTD
Oligo dT(17) primer	Bioservice unit

Penicillin-Streptomycin Solution (10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin)	HyClone
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
RAGE primers	Bioservice unit
Sodium hydroxide	Carlo Erba reagent
Sucrose	Ajax Finechem
SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen
Tetrahydrofuran	Fluka
Tris base	Promega corporation
TRIZOL® Reagent	Invitrogen
Trypan blue stain	Gibco
Trypsin	HyClone

3.2 การเตรียมสารสกัดขมิ้นชัน

ส่วนของขมิ้นชันที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้คือ ส่วนเหง้า แสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งผู้วิจัยซื้อเหง้าขมิ้นชันมาทั้งหมด 3 กิโลกรัม จากร้านสมุนไพร ปากคลองตลาด กรุงเทพมหานคร และขมิ้นชันนี้ปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี

ภาพที่ 8 แสดงเหง้าขมิ้นชันที่ใช้ในงานวิจัย เหง้าขมิ้นชันนี้ซื้อมาจากร้านสมุนไพร ปากคลองตลาด กรุงเทพมหานคร และปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี

นำขมิ้นชันมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น จึงหั่นเหง้าขมิ้นชันให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำขมิ้นชันไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยน้ำหนักของขมิ้นชันก่อนทำการอบแห้ง เท่ากับ 2727.90 กรัม เมื่อครบ 3 วัน นำขมิ้นชันที่แห้งดีแล้วออกจากตู้อบ (น้ำหนักขมิ้นชันแห้ง เท่ากับ 316.55 กรัม) นำขมิ้นชันแห้งไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (บริษัท Philips) และนำผงขมิ้นชันมาแช่ใน 80% เอธานอลในสัดส่วนผงขมิ้นชัน 100 กรัม ต่อ 80% เอธานอล 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์มาห่อขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ที่แช่ผงขมิ้นชันเพื่อป้องกันแสง

ระหว่างนี้ให้เขย่าบ่อยๆ เมื่อครบเวลา นำสารสกัดขมิ้นชันมากรองผ่านกระดาษกรอง qualitative 1 (บริษัท Whatman Limited) และเก็บสารสกัดไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และห่อภาชนะที่เก็บสารสกัดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง นำผงขมิ้นชันที่ได้จากการกรองไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อทำการสกัดขมิ้นชันอีกครั้งซึ่งวิธีทำเหมือนกับที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อได้สารสกัดขมิ้นชันครั้งที่ 2 แล้ว ให้นำสารสกัดขมิ้นชันทั้งหมดมาเทรวมกันและนำไประเหยเพื่อเอา 80% เอธานอลออกให้หมดด้วยเครื่อง rotary evaporator (บริษัท Heidolph Instruments) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในที่สุด จะได้สารสกัดจากขมิ้นชันอย่างหยาบที่มีลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลเข้ม ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และทำการจดบันทึกเก็บไว้ ค่อยๆ เทสารสกัดลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ที่ห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ (น้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 35.68 กรัม) และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ (Kim et al., 2005)

3.3 การวัดปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นชัน (ปราณี ชวลิตธำรง และคณะ, 2544)

วัดปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นชัน เพื่อตรวจสอบคุณภาพของสารสกัดขมิ้นชัน โดยปริมาณของเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นชันต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเป็นเคอร์คิวมิน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คิวมิน นำสารมาตรฐานเคอร์คิวมิน (บริษัท Fluka) จำนวน 2 มิลลิกรัม มาละลายด้วยเมธานอล (บริษัท Merck) ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรผสมให้เข้ากันแล้วจึงแยกดูดสารละลายมาตรฐานเคอร์คิวมิน 20, 40, 50, 60, 80, 100, 120, และ 160 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรแต่ละขวด เติมเมธานอลจนได้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายมาตรฐานเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 0.8, 1.6, 2.0, 2.4, 3.2, 4.0, 4.8, และ 6.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องโฟโตมิเตอร์ (บริษัท Chem-Labs Limited) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานเคอร์คิวมิน

นำสารสกัดขมิ้นชัน 300 มิลลิกรัม บรรจุลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารเตตระไฮโดรฟูแรน (บริษัท Fluka) จนได้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าบ่อยๆ (ห่อภาชนะที่ใส่สารละลายตัวอย่างด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง) เมื่อครบเวลา ดูดสารละลายใสของสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมเมธานอลจนได้ปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายที่ได้มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมเมธานอล

จนได้ปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องโฟโตมิเตอร์ (บริษัท Chem-Labs Limited) คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเคอร์คิวมินอยด์คำนวณเป็นเคอร์คิวมินจากน้ำหนักสารสกัดขมิ้นชัน โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของเคอร์คิวมิน

3.4 การเตรียม Stock solution

เพื่อเตรียมสารสกัดขมิ้นชันให้เป็นสารละลายตั้งต้น (stock solution) เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

นำสารสกัดขมิ้นชันมาละลายด้วยไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ให้ได้สารละลายตั้งต้นที่ความเข้มข้น 0.5 กรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำสารละลายตั้งต้นไปกรองผ่านหัวกรองปราศจากเชื้อที่มีรูขนาด 0.2 ไมครอน (บริษัท Corning Incorporation) โดยนำหัวกรองที่ปราศจากเชื้อต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาที่ปราศจากเชื้อ ค่อยๆ รินสารละลายตั้งต้นลงในกระบอกฉีดยา แล้วฉีดสารละลายตั้งต้นผ่านหัวกรองลงสู่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ ห่อหลอดทดลองด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ให้เรียบร้อยเพื่อป้องกันแสง แล้วนำสารละลายตั้งต้นของสารสกัดขมิ้นชันไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบ

เพื่อยืนยันว่าสารละลายตั้งต้นของสารสกัดขมิ้นชันปลอดเชื้อจริง จึงนำสารละลายตั้งต้นไปทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดูว่ามีเชื้อแบคทีเรียเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือไม่

3.5 การคัดเลือกเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

คุณสมบัติของเซลล์ที่ต้องการใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ต้องเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ RAGE ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนสูง มีความสามารถในการลุกลามสูง และการแสดงออกของ RAGE ต้องมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการลุกลามของเซลล์ ดังรายงานก่อนหน้านี้ (Bhawal et al., 2005; Hirata et al., 2003; Kuniyasu et al., 2001; Takada et al., 2001) แต่เนื่องจากข้อจำกัดหลายด้าน ผู้วิจัยจึงไม่สามารถใช้เซลล์เหล่านั้นได้ ผู้วิจัยจึงคัดเลือกเซลล์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้แก่

1 Human colon adenocarcinoma SW480 ได้รับมาจาก ศ.นพ.คร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 Human cervical cancer cell HeLa ได้รับมาจาก รศ.คร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 Human colon adenocarcinoma HT-29 ได้รับมาจาก ผศ.คร.วีระ วงศ์คำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4 Human liver hepatoblastoma HepG2 ได้รับมาจาก รศ.พญ.คร.ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 Human larynx carcinoma HEp2 ได้รับมาจาก ศ.คร.พรเทพ เทียนสิวากุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6 Human keratinocyte HaCaT ได้รับมาจาก ผศ.พญ.คร.จงกลนี วงศ์ปิยะบวร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำเซลล์ทั้งหมด ซึ่งได้แก่ เซลล์มะเร็ง 5 ชนิด และเซลล์ปกติ 1 ชนิด มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน RAGE mRNA ในแต่ละเซลล์ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำเซลล์ทั้งหกชนิดมาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้น้ำยา TRIZOL®Reagent (บริษัท Invitrogen) และนำอาร์เอ็นเอของแต่ละเซลล์เข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (บริษัท Invitrogen) โดยใช้ GAPDH primers (บริษัท Invitrogen) เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ลำดับเบสของ primers ที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการทำ RT-PCR แสดงดังตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบส primers และขนาดผลผลิต RT-PCR ที่ใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

Gene	Sequence	Size (bp)
RAGE	Forward primer 5'-GTAAGCGGGGCTCCTGTTGCA-3' Reverse primer 5'-GGCCAAGGCTGGGGTTGAAGG-3'	397
GAPDH	Forward primer 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' Reverse primer 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	266

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ RT-PCR สำหรับชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase

	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		เวลา	จำนวนรอบ
		RAGE primers	GAPDH primers		
1	cDNA synthesis	60	60	30 นาที	1
2	Initial denaturation	94	94	2 นาที	1
3	Denature Annealing Extension	94 65 68	94 58 68	30 วินาที 30 วินาที 1 นาที	35
4	Final extension	68	68	10 นาที	1

ในการทำ RT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน RAGE ในแต่ละเซลล์นี้ ควรทำ negative control ควบคุมทุกครั้ง เพื่อยืนยันว่าอาร์เอ็นเอตัวอย่างที่นำมาทำ RT-PCR ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอ ซึ่งการทำ negative control นี้ ให้ใส่ *Taq* DNA Polymerase ลงไปแทนเอนไซม์ SuperScript™ III RT/Platinum® *Taq* DNA Polymerase Mix ของชุดน้ำยาสำเร็จรูปนี้ ดังนั้น อาร์เอ็นเอตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอ จะไม่เกิดการสังเคราะห์ cDNA ในหลอดของ negative control นำผลผลิต RT-PCR ไปแยกบน 2% อะกาโรสเจล (บริษัท ISC BioExpress) ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟเรซิส (electrophoresis) ที่ศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45-60 นาที และใช้ 100 bp DNA ladder (บริษัท Fermentas) เป็น standard DNA marker นำแผ่นเจลไปแช่ลงในสารละลาย ethidium bromide (บริษัท Sigma) เพื่อย้อมดีเอ็นเอเป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วจึงนำแผ่นเจลมาล้างในน้ำกลั่นนาน 15 นาที บันทึกภาพแผ่นเจล

3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ SW480 (Human colon adenocarcinoma SW480) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa (Human cervical cancer cell HeLa) ซึ่งมีการแสดงออกของยีน RAGE มากที่สุด เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เหลือในขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์สำหรับการวิจัย เซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (บริษัท Hyclone) ที่มี 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (บริษัท Hyclone), 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin Solution (บริษัท Hyclone) และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin (บริษัท Invitrogen) เลี้ยงเซลล์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และระดับความชื้น 80%

3.6.1 การถ่ายเซลล์ (subculture)

เมื่อเซลล์เจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง ให้ทำการถ่ายเซลล์ลงสู่จานเพาะเลี้ยงจานใหม่ ก่อนอื่นให้ตรวจดูลักษณะและสภาพของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (บริษัท Olympus) ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์มะเร็ง HeLa จะมีลักษณะแผ่ไปกับพื้นของจานเพาะเลี้ยง มีรูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยม เมื่อเจริญเต็มที่ เซลล์มะเร็ง HeLa สามารถแผ่ตัวครอบคลุมพื้นจานเพาะเลี้ยงจนหมด สำหรับเซลล์มะเร็ง SW480 จะมีรูปร่างเป็นกระสวย ส่วนใหญ่จะอยู่เป็นกลุ่ม เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่ จะไม่แผ่กระจายครอบคลุมพื้นจานเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับเซลล์มะเร็ง HeLa แต่เซลล์จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่

มากกว่า เซลล์ที่จะถ่ายลงสู่จานเพาะเลี้ยงจานใหม่ควรมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 80% (80% confluent) และไม่จำเป็นต้องรอให้อาหารเลี้ยงเซลล์กลายเป็นสีเหลือง อาจเป็นเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและ/หรือราได้

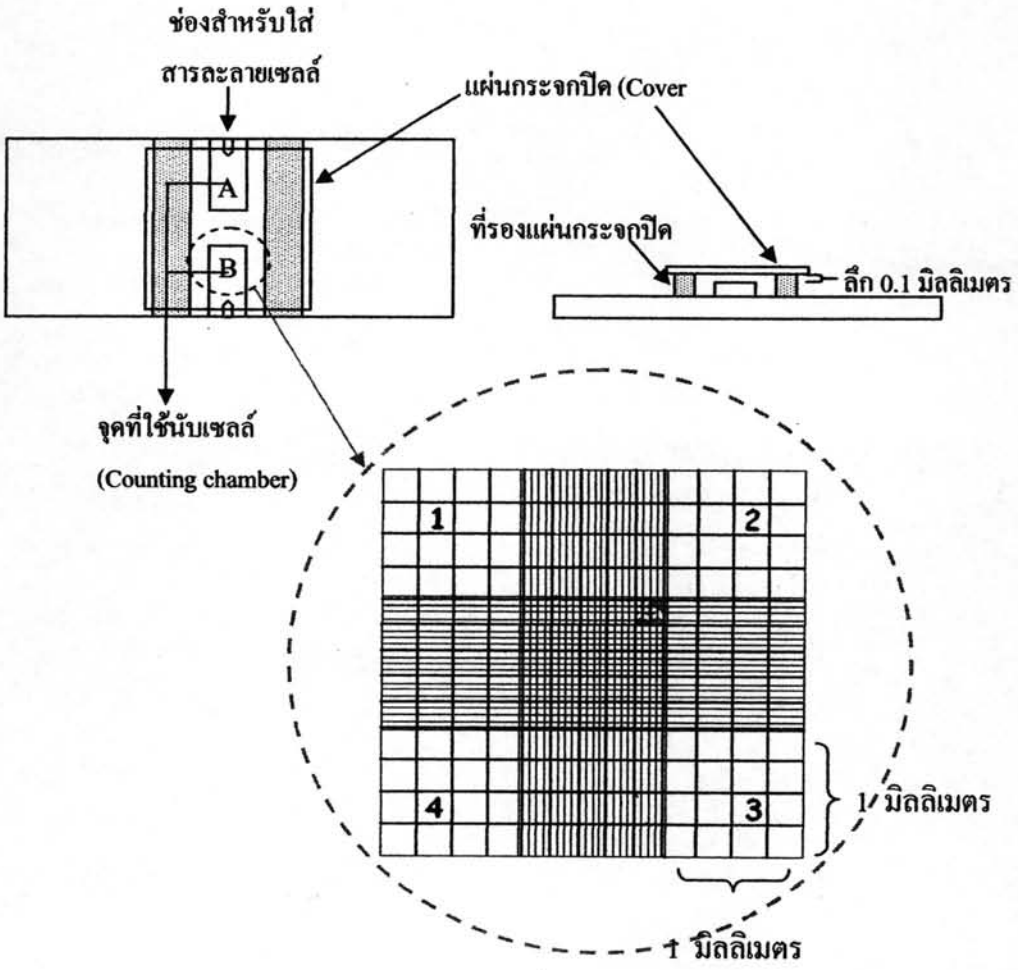
ก่อนทำการถ่ายเซลล์ให้นำ 1X phosphate buffered saline (PBS) (บริษัท JRH Biosciences), 0.25% ทริปซิน (บริษัท HyClone) และอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin Solution และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin) ไปอุ่นใน water bath (บริษัท Memmert) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วทำความสะอาดด้วย 80% เอธานอล รอบหลอดที่บรรจุสารเหล่านี้ ก่อนนำสารเหล่านี้ไปใช้ขั้นตอนการถ่ายเซลล์ดังนี้ เทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากจานเพาะเลี้ยงให้หมด แล้วจึงเติม 1X PBS ลงไป 5 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ หมุนวนจานเพาะเลี้ยงไป-มา เพื่อให้ล้างเซลล์ได้ทั่วถึง เท PBS ทิ้ง แล้วเติม PBS เพื่อล้างเซลล์อีกครั้ง เท PBS ออกให้หมด ปิเปต 0.25% ทริปซินลงไป 1 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นจานเพาะเลี้ยง อย่าฉีดทริปซินลงไปโดนเซลล์โดยตรง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เททริปซินออกหมด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นจานเพาะเลี้ยงได้ดียิ่งขึ้น เมื่อครบเวลา นำจานเพาะเลี้ยงออกมาจากตู้บ่ม จะเห็นพื้นจานเพาะเลี้ยงในด้านที่มีเซลล์เกาะเป็นฝ้าขาว เอามือตบที่ด้านข้างจานเพาะเลี้ยงเบาๆ 2-3 ครั้ง แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ฉีดอาหารเลี้ยงเซลล์ล้างด้านที่มีเซลล์เกาะเพื่อให้เซลล์หลุด แล้วจึงดูดเซลล์ขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในจานเพาะเลี้ยงจานใหม่แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไปให้ครบ 5 มิลลิลิตร นำเข้าไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และระดับความชื้น 80% เซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

3.6.2 การนับเซลล์

การนับเซลล์ เป็นขั้นตอนพื้นฐานที่มีความสำคัญขั้นตอนหนึ่ง ช่วยให้ทราบจำนวนเซลล์ที่มี หรือถ้าต้องการจะใช้เซลล์จำนวนหนึ่งควรจะต้องปิเปตเซลล์มาเท่าไหร่ หรือเป็นการหาเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต (%viability) โดยอาศัยการย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue (บริษัทGibco) ซึ่งเซลล์ที่ตายแล้ว สี trypan blue จะสามารถแทรกผ่านเข้าไปทางเมมเบรนและทำให้เซลล์เกิดการติดสีได้ ขั้นตอนการนับเซลล์มีดังนี้ นำสารละลายเซลล์มาเจือจางกับสี trypan blue ในสัดส่วน 1:10 (เช่น สารละลายเซลล์ 10 ไมโครลิตร + สี trypan blue 90 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ สัดส่วนการเจือจางสารละลายเซลล์กับสี trypan blue สามารถปรับเปลี่ยนได้ แต่ไม่ควรใส่สี trypan blue ในปริมาณที่น้อยเกินไป ปิเปตสารละลายเซลล์ที่ผ่านการเจือจางแล้วปริมาณ

10 ไมโครลิตร ลงใน hemocytometer counting chamber (บริษัท HBG) ที่มีแผ่นกระจกใสปิดอยู่ ค่อยๆ ปิเปตสารละลายเซลล์เข้าไป รอให้สารละลายเซลล์กระจายตัวทั่วบริเวณที่นับเซลล์

การนับเซลล์ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีลักษณะเป็นเซลล์กลมและใส ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วนั้นจะติดสีน้ำเงินของสี trypan blue ให้นับจำนวนเซลล์จากพื้นที่ใหญ่ทั้งหมด 4 พื้นที่ (แต่ละช่องใหญ่มีขนาด 1 mm x 1 mm) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า และนับทั้งสองด้านของ counting chamber (บริเวณ A และ B) จดบันทึกจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย hemocytometer counting chamber และบริเวณที่ใช้นับเซลล์แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดง hemocytometer counting chamber และบริเวณที่ใช้นับเซลล์

นำจำนวนเซลล์ตามที่นับได้มาคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในหน่วย เซลล์/มิลลิลิตร ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ (cells/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ x dilution factor}}{\text{จำนวนช่องที่นับ x ปริมาตรของพื้นที่ที่ใช้นับเซลล์}}$$

ปริมาตรของพื้นที่ที่ใช้นับเซลล์ เท่ากับ $1 \times 1 \times 0.1 = 0.1\ mm^3 = 10^{-4}$ ml

Dilution factor เท่ากับ 10

จำนวนช่องที่นับ นับเซลล์จากบริเวณ A และ B ในแต่ละบริเวณนับทั้งหมด 4 ช่องใหญ่ (บริเวณหมายเลข 1-4) ดังนั้น จำนวนช่องที่นับ เท่ากับ 8 ช่อง

เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต สามารถคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{\% cell viability} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต}}{\text{(จำนวนเซลล์มีชีวิต + จำนวนเซลล์ตาย)}} \times 100$$

เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตที่เหมาะสมสำหรับนำมาทดสอบ ควรมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตตั้งแต่ 80% ขึ้นไป

3.6.3 การแช่แข็งเซลล์ (Freezing cell)

เมื่อต้องการเก็บรักษาเซลล์ ควรนำเซลล์มาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวและควรค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิให้แก่เซลล์ วิธีการเตรียมเซลล์ใช้วิธีเดียวกันกับวิธีการถ่ายเซลล์และการนับเซลล์ในหัวข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกให้หมด แล้วจึงล้างเซลล์ด้วย PBS สองครั้ง ปิเปต 0.25% ทริปซินลงไป เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นจานเพาะเลี้ยง แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป ปิเปตสารละลายเซลล์มานับบน hemocytometer counting chamber เพื่อต้องการทราบจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ เมื่อทราบจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ จึงนำมาคำนวณหาปริมาณของสารละลายเซลล์ที่ต้องปิเปตเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ตามที่ต้องการ โดยในหลอด cryovial ขนาด 2 มิลลิลิตร (บริษัท Simport plastics) สามารถเก็บเซลล์ได้ประมาณ 2-5 ล้านเซลล์/มิลลิลิตร/หลอด จากนั้น ปิเปตเซลล์ตามปริมาณที่ได้จากการคำนวณข้างต้นลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เท

อาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งให้หมด เติม FBS ที่เย็นลงไป 900 ไมโครลิตรและเติม DMSO 100 ไมโครลิตร ตามลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลง แล้วถ่ายสารละลายเซลล์ทั้งหมดลงในหลอด cryovial นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น จึงย้ายเก็บไปที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สุดท้าย จึงนำไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

3.6.4 การละลายเซลล์ (Thawing cell)

เมื่อต้องการนำเซลล์ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวมาใช้ ควรละลายเซลล์ด้วยความรวดเร็ว ก่อนอื่น ให้ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ (ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin Solution และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin) ที่อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เรียบร้อยแล้วลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 5 มิลลิลิตร ไว้ก่อน แล้วจึงนำเซลล์ออกจากถังไนโตรเจนเหลว รีบนำเซลล์ไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 นาที เพื่อให้เซลล์ละลายและห้ามแกว่งนานเกิน 2 นาที เนื่องจาก DMSO อาจทำลายเซลล์ได้ แล้วจึงปิเปตเซลล์ทั้งหมดลงไปในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์เตรียมไว้แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ค่อยๆ เคาะให้ตะกอนเซลล์คลายตัวออกจากกันแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ถ่ายใส่จานเพาะเลี้ยง นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และระดับความชื้น 80% เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ให้แก่เซลล์ เพื่อให้เซลล์แข็งแรงเร็วขึ้น

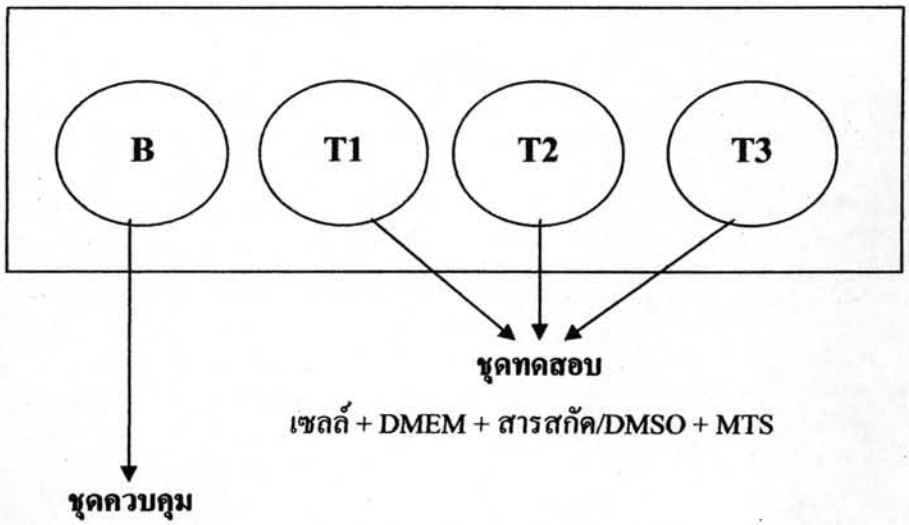
3.7 การทดสอบ Proliferation assay

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480 ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay หรือ MTS assay (บริษัท Promega corporation)

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม หลุมละ 5,000 เซลล์ ใน 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะพื้น เมื่อครบเวลา นำสารละลายตั้งต้นของสารสกัดขมิ้นชันมาเจือจางด้วยอาหาร

เลี้ยงเซลล์ (ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin Solution และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin) เพื่อให้ได้สารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งให้หมดแล้วจึงเติมสารสกัดที่เตรียมไว้ลงในแต่ละหลุม (ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร) โดยสารสกัดแต่ละความเข้มข้นจะทำการทดสอบซ้ำสามหลุมและให้หลุมที่มีเซลล์ทดสอบกับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม (control group) นอกจากนี้ เนื่องจากสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ในการทดสอบ ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายเพื่อเตรียมเป็นสารละลายตั้งต้นและ DMSO เป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ ดังนั้น จึงต้องทดสอบเซลล์กับสารละลาย DMSO เพื่อยืนยันว่า สารละลาย DMSO ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ สารละลาย DMSO เตรียมจากการเจือจาง DMSO (บริษัท Sigma) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1% เนื่องจากเป็นความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดลอง นำจานทดสอบไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้น เติมน้ำยา MTS (บริษัท promega corporation) ลงไป 30 ไมโครลิตร/หลุม นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์อีกครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยเครื่องโฟโตมิเตอร์ (บริษัท Anthos)

แต่สารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการศึกษาเป็นสารมีสีซึ่งอาจส่งผลรบกวนการวัดการดูดกลืนแสง ดังนั้น จึงทำการแก้ไขปัญหาการรบกวนนี้ โดยทำหลุมควบคุมควบคู่ไปกับการทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชัน หลุมควบคุมนี้ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดขมิ้นชัน/DMSO และน้ำยา MTS แต่ไม่มีเซลล์ แสดงดังภาพที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากหลุมควบคุมนี้จะถูกนำมาหักลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดสอบในแต่ละหลุมเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ถูกต้องยิ่งขึ้น (promega corporation, technical bulletin No. 245) จากภาพที่ 10 นั่นคือ นำค่าการดูดกลืนแสงจากหลุม B มาหักลบออกจากค่าการดูดกลืนจากหลุม T1, T2 และ T3 ตามลำดับ



ภาพที่ 10 แสดงการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสารสกัดขมิ้นชันเป็นสารมีสีซึ่งอาจส่งผลรบกวนการวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ดังนั้น จึงมีการทำชุดควบคุมขึ้นมาเพื่อแก้ไขปัญหานี้ ในหลุม B คือ ชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ + สารสกัดขมิ้นชัน/DMSO + น้ำยา MTS ส่วนในหลุม T1-T3 เป็นชุดทดสอบซึ่งประกอบด้วย เซลล์ + อาหารเลี้ยงเซลล์ + สารสกัดขมิ้นชัน/DMSO + น้ำยา MTS ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากหลุมควบคุมนี้จะถูกนำมาหักลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดสอบเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์มีชีวิต (% cell viability) จากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cells}}{\text{Absorbance of control cells}} \times 100$$

Absorbance of treated cells ค่าการดูดกลืนแสงจากหลุมที่ทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันหรือ DMSO

Absorbance of control cells ค่าการดูดกลืนแสงจากหลุมที่ทดสอบเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกันนี้ซ้ำสามครั้งเพื่อยืนยันผลและหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ที่ 50% (IC_{50})

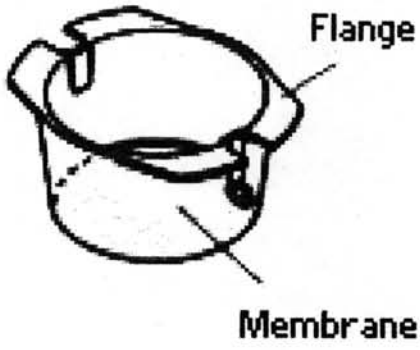
3.8 การทดสอบ Matrigel invasion assay

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480 ด้วยเทคนิค matrigel invasion assay ซึ่งเทคนิคการทำ matrigel invasion assay นี้ ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากนายแพทย์ ดร.กวิญ ลีละวัฒน์ โรงพยาบาลราชวิถี และคุณศิริลักษณ์ นารอง ที่กรุณาให้คำแนะนำและถ่ายทอดเทคนิคการทำ matrigel invasion assay ซึ่งผู้วิจัยได้ปรับรายละเอียดในบางขั้นตอนเพื่อความเหมาะสมในการศึกษาวิจัย

การเตรียมเซลล์ นำเซลล์มะเร็งจำนวน 1-5x10^5 เซลล์/มิลลิลิตร มาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิเมตร x 20 มิลลิเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% FBS (ประกอบด้วย DMEM, 1% FBS, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin Solution และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin) เพื่อเพื่อทำให้เซลล์อดอยาก (starvation) แล้วนำเข้าตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำ Matrigel™ Basement Membrane Matrix (บริษัท Becton Dickinson Labware) ออกมากจากตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็ง matrigel ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความเข้มข้นตั้งต้น 9.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (Becton Dickinson Biosciences, product specification sheet lot number: 56966) ซึ่งความเข้มข้นตั้งต้นของ matrigel แต่ละ lot อาจมีไม่เท่ากัน เมื่อ matrigel ละลายดีแล้ว จึงนำ matrigel มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เพียงอย่างเดียว ไม่ต้องใส่ซีรัมและยาต้านจุลชีพ) ให้ได้สารละลาย matrigel ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 และ 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร สำหรับเซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง HeLa ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ และระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ใช้คีมที่เผาไฟฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วคีบ insert (บริษัท Becton Dickinson Labware) ซึ่งแสดงดังภาพที่ 11 มาวางไว้ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (บริษัท Becton Dickinson Labware) ปิเปตสารละลาย matrigel ลงไปใน insert insert ละ 100 ไมโครลิตร เพื่อเคลือบเนื้อเยื่อ (membrane) ของ insert แล้วจึงนำเข้าตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว

<u>หมายเหตุ</u> อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลาย matrigel ได้แก่ tip หลอดทดลองสำหรับเตรียมสารละลาย matrigel และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมต้องเย็น ดังนั้น ควร

แช่เย็นอุปกรณ์เหล่านี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ มิฉะนั้น สารละลาย matrigel อาจจะแข็งก่อนที่จะเคลือบบนเนื้อเยื่อใน insert ได้



ภาพที่ 11 แสดง insert ที่ใช้ในการทำ matrigel invasion assay ซึ่งมีขนาดรูที่เมมเบรนเท่ากับ 8 ไมครอน (Becton Dickson Labware, Guidelines for using BD Folcon™ cell culture inserts)

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง นำ insert ที่ทำการเคลือบ matrigel ไว้เมื่อวาน ออกมาจากตู้บ่ม ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% FBS (ประกอบด้วย DMEM, 1% FBS, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin Solution และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin) ลงไป 500 ไมโครลิตร/insert แล้วจึงนำ insert ไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์อีกครั้ง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เจลโพลิเมอไรซ์ดีขึ้น ในระหว่างนั้น นำเซลล์มะเร็งที่เตรียมไว้เมื่อออกมาจากตู้บ่ม ตรวจดูสภาพและลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (บริษัท Olympus) ที่ขนาดกำลังขยาย 100 และ 400 เท่า ก่อนนำเซลล์ไปใช้ จากนั้น เข้าสู่กระบวนการเตรียมสารละลายเซลล์ โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกให้หมด แล้วจึงล้างเซลล์ด้วย 1X PBS เป็นจำนวนสองครั้ง เท PBS ทิ้งออกให้หมด ปิเปต 0.25% ทริปซินลงไปประมาณ 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์ เมื่อครบเวลา ให้ปิเปตทริปซินออกให้หมด แล้วนำเซลล์เข้าตู้บ่มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดง่ายขึ้น เมื่อครบเวลา นำเซลล์ออกมาจากตู้บ่ม ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% FBS ลงไป 5 มิลลิลิตร และฉีดอาหารเลี้ยงเซลล์ล้างพื้นจานเพาะเลี้ยงเพื่อให้เซลล์หลุดให้หมด ถ่ายเซลล์ลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้น เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ค่อยๆ เคาะด้านข้างของหลอดทดลองเพื่อให้เซลล์คลายตัวออกจากกัน ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% FBS ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้า

กันแล้วนำไปนับเซลล์ เมื่อทราบจำนวนเซลล์ที่มีแล้วจึงคำนวณหาปริมาณที่ต้องปิเปตเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ตามที่ต้องการ จำนวนเซลล์ที่ใช้เท่ากับ 0.5-1x10^5 เซลล์/ insert เมื่อทราบปริมาณเซลล์ที่ต้องใช้ในแต่ละ insert แล้ว จึงเตรียมสารละลายเซลล์สำหรับแต่ละ insert ซึ่งประกอบด้วยปริมาณเซลล์ที่ต้องปิเปตรวมกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ (10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% FBS ให้ปริมาตรสุดท้ายครบ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ เมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง นำ insert ออกมาจากตู้บ่มและดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่หล่อเจลไว้ออกเบาๆ โดยไม่ให้กระทบกระเทือนเจล จากนั้น จึงเติมสารละลายเซลล์ที่เตรียมเมื่อครู่ลงไป 500 ไมโครลิตร/insert และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS (ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin Solution และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นสารดึงดูด (chemoattractant) ระวังอย่าให้มีฟองอากาศที่ใต้ insert เนื่องจากฟองอากาศอาจส่งผลต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งได้ นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเซลล์มะเร็ง HeLa และเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับเซลล์มะเร็ง SW480

หมายเหตุ

1. ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการศึกษา matrigel invasion assay นี้ ได้จากผลการทดสอบ proliferation assay โดยเลือกความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่ไม่เกินค่า IC_{50} เพราะว่าถ้าเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่านี้อาจส่งผลให้เซลล์มะเร็งตายได้
2. การทดสอบเซลล์กับสารสกัดในแต่ละความเข้มข้นจะทำซ้ำสามครั้งและให้เซลล์ที่ทดสอบกับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุมนอกจากนี้ จึงต้องทดสอบเซลล์กับสารละลาย DMSO ด้วย เนื่องจากใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายเพื่อเตรียมสารละลายตั้งต้นของสารสกัดขมิ้นชันเพื่อยืนยันว่าสารละลาย DMSO ไม่ส่งผลต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO เท่ากับ 0.1%

เมื่อครบเวลาบ่มของแต่ละเซลล์ จึงนำเซลล์ออกมาจากตู้บ่ม แล้วเข้าสู่กระบวนการย้อมเซลล์ โดยเริ่มจากการตรึง (fix) เซลล์โดยเติม 70% เอธานอลลงไปในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุมอีกจานหนึ่ง ปิเปต 70% เอธานอลลงไปหลุมละ 1 มิลลิลิตร จากนั้น จึงย้าย insert ลงไปแช่ใน 70% เอธานอลที่เตรียมไว้ แช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เปิดน้ำก๊อกไหลผ่านลงบน insert เบาๆ เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อล้างเอธานอลออก เมื่อครบเวลา เทน้ำออกจาก insert แล้วจึงปิเปต

haematoxylin (บริษัท C.V. Laboratories co., LTD) ลงไปในหลุมของจานเพาะเลี้ยงจานแรก หลุมละ 1 มิลลิลิตร ย้าย insert ลงไปแช่ใน haematoxylin เป็นเวลา 15 นาที เพื่อย้อมเซลล์ เมื่อครบเวลาเปิดน้ำก๊อกไหลผ่านลงบน insert เบาๆ เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อล้างสีส่วนเกินออกให้หมด เมื่อครบเวลา จึงเทน้ำออกแล้วนำสำลีพันก้านที่ปราศจากเชื้อเช็ดพื้นด้านในของ insert เพื่อเอาเซลล์ที่ไม่ได้เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อลงไปสู่ด้านล่างออกไป การเช็ดพื้นด้านในของ insert ควรเช็ดเบาๆ หากกดแรงเกินไปอาจทำให้ insert ทะลุได้และไม่ใช้สำลีพันก้านซ้ำอันเดิม จากนั้น จึงปิเปต eosin (บริษัท C.V. Laboratories co., LTD) ลงไปในจานเพาะเลี้ยงจานที่สอง หลุมละ 1 มิลลิลิตร ย้าย insert ลงไปแช่ใน eosin เป็นเวลา 15 นาที เพื่อย้อมเซลล์อีกครั้ง เมื่อครบเวลา เปิดน้ำก๊อกไหลผ่านลงบน insert เบาๆ เป็นเวลา 5-10 นาที เทน้ำออกและจุ่ม insert ลงในเอธานอลสองครั้ง เพื่อให้ insert แห้งเร็วขึ้น นำสำลีพันก้านเช็ดพื้นด้านในของ insert อีกครั้ง คว่ำ insert ไว้กับกระดาษทิชชูจนกว่า insert จะแห้ง แล้วจึงนำไปนับเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert

การนับเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ลงมาสู่ด้านล่าง มีขั้นตอนการเตรียม insert ดังนี้ คว่ำ insert ลงกับพื้นแล้วจึงใช้ใบมีดคัตเตอร์ค่อยๆ กรีดที่ก้นซึ่งคือ เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert อย่างเบามือ แล้วจึงใช้คีมคีบแผ่นเนื้อเยื่อวางบนกระจกสไลด์ ทาน้ำยาเคลือบเล็บให้ทั่วแผ่นเนื้อเยื่อเมมเบรนแล้วปิดด้วยกระจกบาง (cover glass) กดบนแผ่นกระจกบางให้ทั่วเพื่อไล่ฟองอากาศออกให้หมด ทาน้ำยาเคลือบเล็บรอบแผ่นกระจกบางอีกครั้ง ผึ่งไว้ให้แห้งแล้วจึงนำไปนับเซลล์เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่ลุกลามผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย x400 โดยสุ่มเลือกนับทั้งหมด 6 ฟิลด์ต่อ insert ทำการทดสอบเช่นเดียวกันนี้ซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันผล

3.9 การทดสอบ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการแสดงออกของ RAGE ในระดับ mRNA ของเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480

3.9.1 การเพาะเลี้ยงและการทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชัน

นำเซลล์มะเร็งจำนวน 1-4x10^6 เซลล์ มาเลี้ยงไว้ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 100 มิลลิเมตร x 20 มิลลิเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% FBS (ประกอบด้วย DMEM, 1% FBS, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin Solution และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้เซลล์เกาะพื้นจานเพาะเลี้ยง เมื่อครบเวลา นำเซลล์ออกมาจากตู้บ่ม ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและล้างเซลล์ด้วย 1X PBS เป็นจำนวนสองครั้ง เท PBS ทิ้งออกให้หมดและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป (10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% FBS ในการเตรียมสารสกัดขมิ้นชัน และให้เซลล์ที่ทดสอบกับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม นำเซลล์เข้าตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.9.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

เมื่อครบเวลาที่ทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชัน จึงทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบชุดน้ำยา TRIZOL® Reagent (บริษัท Invitrogen) โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งให้หมดและเติม 1X PBS ที่เย็นลงไป 5 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ ทำการล้างเซลล์ซ้ำสองครั้ง และดูด PBS ออกให้หมด และวางจานเพาะเลี้ยงไว้บนน้ำแข็ง จากนั้น ทำให้เซลล์แตกโดยการเติมน้ำยา TRIZOL ที่เย็นลงไป 2 มิลลิลิตร ปิเปตขึ้นลงหลายครั้งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ปิเปตสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตรลงไปในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์มที่เย็นลงไป 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเขย่าแรงๆ หรือปั่นแรงๆ นาน 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง micro high speed refrigerated centrifuge (บริษัท Vision Scientific Co., Ltd) ด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายเซลล์จะแยกออกเป็นสามชั้น ชั้นบนสุด เป็นชั้น aqueous phase ซึ่งเป็นน้ำใส ไม่มีสี และเป็นชั้นที่มีอาร์เอ็นเออยู่ ดังนั้น จึงปิเปตเฉพาะชั้น aqueous phase มา 300 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมไอโซโพรพานอลที่เย็นลงไป 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้อาร์เอ็นเอตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง เทของเหลวใสส่วนบนทิ้งเบาๆ แล้วจึงปิเปต 75% เอธานอลลงไป 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างอาร์เอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างอาร์เอ็นเอสามครั้ง จนถึงครั้งสุดท้ายให้เทเอธานอล ออกให้หมด แล้วจึงคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูที่ฉีดด้วยน้ำยา RNase Away เพื่อกำจัด RNase จากสิ่งแวดล้อมที่อาจมาทำลายอาร์เอ็นเอได้ ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที ไว้เพื่อตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง เมื่อตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งดีแล้วจึงเติม DEPC-treated water ลงไป 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ นำไปบ่มใน block heater (บริษัท Wealtec Corp.) ที่

อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ เมื่อครบเวลา นำสารละลายอาร์เอ็นเอไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.9.3 การวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

เพื่อหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (Abs_{260}) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจะประมาณ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Sambrook et al., 2001)

นำสารละลายอาร์เอ็นเอจากตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็งและวางไว้บนน้ำแข็งตลอด ปิเปตสารละลายอาร์เอ็นเอ 2 ไมโครลิตร มาเจือจางในน้ำกลั่น 998 ไมโครลิตร (1:500) ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้น ปิเปตดูดสารละลายอาร์เอ็นเอใส่ลงในคิวเวตต์ควอตซ์แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (บริษัท Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอในหน่วยไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

$$[RNA] = Abs_{260} \times \text{dilution factor} \times 40$$

ความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอประเมินได้จากสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (Abs_{260}/Abs_{280}) โดยอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าสัดส่วนเท่ากับ 2.0 และสำหรับกรดนิวคลีอิกที่บริสุทธิ์จะมีสัดส่วนจะอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 แต่ถ้าสัดส่วนมีค่าน้อยกว่า 1.7 บ่งว่าอาจมีสิ่งปนเปื้อนในสารละลายนี้ โดยทั่วไปมักจะเป็นโปรตีนหรือฟีนอล (Sambrook et al., 2001)

3.9.4 การทำ Deoxyribonuclease I

เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนในตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ก่อนที่จะนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Deoxyribonuclease I (DNase I) (บริษัท Invitrogen)

นำหลอดทดลองมาวางไว้บนน้ำแข็ง แล้วจึงปิเปตสารต่างๆ ดังต่อไปนี้ลงไป

ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ	1	ไมโครกรัม
10X Dnase I reaction buffer	1	ไมโครลิตร (Final conc. 1X)
1 U/µl DNase I	1	ไมโครลิตร

เติม DEPC-treated water ให้ปริมาตรสุดท้ายครบ 10 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เติม 25 mM EDTA ลงไป 1 ไมโครลิตร และนำไปบ่มใน block heater ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase I แล้วจึงนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอมาวางไว้บนน้ำแข็งจนกว่าจะนำมาทำ RT-PCR

3.9.5 การสังเคราะห์ complementary DNA

เพื่อสังเคราะห์ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ImProm-II™ Reverse Transcriptase (บริษัท promega incorporation)

การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอและ primer โดยนำหลอดทดลองที่จะใช้วางไว้บนน้ำแข็ง แล้วปิเปตสารต่างๆ ดังต่อไปนี้ลงไป

ตัวอย่างอาร์เอ็นเอไม่เกิน	1	ไมโครกรัม
Oligo $dT_{(17)}$ primer	500	นาโนกรัม

เติม DEPC-treated water ให้ปริมาตรสุดท้ายครบ 5 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ นำไปบ่มใน block heater ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำแข็ง (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที และนำไปวางไว้บนน้ำแข็งจนกว่าจะนำมาใช้

จากนั้น เตรียมส่วนผสม reverse transcription โดยวางหลอดทดลองสำหรับเตรียมส่วนผสมไว้บนน้ำแข็งแล้วปิเปตสารต่างๆ ดังต่อไปนี้ลงไป

ImProm-II™ 5X reaction buffer	4	ไมโครลิตร (Final conc. 1X)
25 mM $MgCl_2$	2.4	ไมโครลิตร (Final conc. 3 mM)
10 mM dNTP	1	ไมโครลิตร (Final conc. 0.5 mM)
40 units/µl RNaseOUT™	0.5	ไมโครลิตร (Final conc. 1U/µl)
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	1	ไมโครลิตร

เติม DEPC-treated water ให้ปริมาตรสุดท้ายครบ 15 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตขึ้นลงเบาๆ แล้วจึงปิเปตส่วนผสมนี้ทั้งหมด 15 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลองที่เตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอไว้ข้างต้น ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสหรือวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ primer เข้าจับกับตำแหน่งอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (anneal) แล้วนำไปบ่มใน block heater ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ cDNA (extend) เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ ImProm-II™ Reverse Transcriptase ด้วยการนำไปบ่มใน block heater ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น จึงวางไว้บนน้ำแข็งเพื่อรอเข้าสู่กระบวนการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

ในการทำ RT-PCR นี้ ต้องทำ negative control เพื่อเป็นการยืนยันว่า ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่นำมาเข้าสู่กระบวนสังเคราะห์ cDNA ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนการทำเหมือนกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ในขั้นตอนการเตรียมส่วนผสม reverse transcription ไม่ต้องใส่เอนไซม์ ImProm-II™ Reverse Transcriptase ลงไป แต่ให้ใส่น้ำลงไปแทน ดังนั้น ในปฏิกิริยาของ negative control นี้ จะไม่เกิดการสังเคราะห์ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ reverse transcriptase และเมื่อนำเข้าสู่กระบวนเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอหรือ PCR ก็จะไม่เกิดผลผลิต PCR ขึ้นมา เนื่องจากแม่แบบเป็นอาร์เอ็นเอ ดังนั้น ในทุกตัวอย่างอาร์เอ็นเอต้องทำ negative control ควบคู่ไปด้วย

3.9.6 การทำ polymerase chain reaction

เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจาก cDNA ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป *Taq* DNA polymerase, recombinant (บริษัท Invitrogen)

การเตรียมส่วนผสม PCR โดยวางหลอดทดลองสำหรับเตรียมส่วนผสมไว้บนน้ำแข็งแล้วปิเปตสารต่างๆ ดังต่อไปนี้ลงไป

10X PCR buffer	2.5 ไมโครลิตร (Final conc. 1X)
10 mM dNTP	0.5 ไมโครลิตร (Final conc. 0.2 mM)
50 mM $MgCl_2$	0.75 ไมโครลิตร (Final conc. 1.5 mM)
10 µM Forward primer	0.125 ไมโครลิตร (Final conc. 0.5 µM)
10 µM Reverse primer	0.125 ไมโครลิตร (Final conc. 0.5 µM)
5 U/µl Taq DNA polymerase	0.125 ไมโครลิตร (Final conc.0.025 U/µl)

เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 21 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตขึ้นลงเบาๆ แล้วจึงปิเปต cDNA 4 ไมโครลิตร ไปลงผสมกับส่วนผสม PCR ผสมให้เข้ากันอีกครั้งด้วยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ แล้วจึงนำเข้าเครื่องสังเคราะห์เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (thermal cycler) เพื่อเข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย และใช้ β-actin primers เป็นตัวควบคุมภายใน ลำดับเบสของ primers และสภาวะที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มจำนวน DNA แสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ในการทำ PCR นี้ ต้องทำ negative control เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารผสม PCR ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอ โดยไม่ต้องเติมดีเอ็นเอไปในสารผสม PCR แต่ให้เติมน้ำลงไปแทน ดังนั้น ในปฏิกิริยาของ negative control นี้ จะไม่เกิดผลผลิต PCR เนื่องจากไม่มีแม่แบบ cDNA และในปฏิกิริยา PCR ของยีน RAGE และยีน β-actin ต้องมีทำ negative control ควบคู่ไปด้วย

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของ primers และขนาดผลผลิต PCR ของยีนเป้าหมายในกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reactions

Primer	Sequence	Size (bp)
RAGE	Forward primer 5'-GTAAGCGGGGCTCCTGTTGCA-3' Reverse primer 5'-GGCCAAGGCTGGGGTTGAAGG-3'	397
β–actin	Forward primer 5'- ACGGGTCACCCACACTGTGC -3' Reverse primer 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATG-3'	863

ตารางที่ 4 แสดงสภาวะที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของแต่ละยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค polymerase chain reactions

	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		เวลา	จำนวนรอบ
		RAGE	β-actin		
1	Initial denaturation	94	94	5 นาที	1
2	Denaturation Annealing Extension	94 60 72	94 58 72	30 วินาที 45 วินาที 90 วินาที	35 สำหรับ RAGE 30 สำหรับ β-actin
3	final extension	72	72	10 นาที	1

3.9.7 Agarose gel electrophoresis

การเตรียมอะกาโรส นำผงอะกาโรสมาผสมกับสารละลาย 0.5X TBE (Tris-borate-EDTA) buffer ให้ได้ความเข้มข้น 2 - 2.5% อะกาโรสเจล เขย่าให้เข้ากันแล้วจึงนำสารละลายเจลไปอุ่นในตู้อบไมโครเวฟ เป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เมื่อสารละลายเจลละลายเข้ากันดีแล้ว จึงวางพักไว้ที่อุณหภูมิห้องสักครู่ แล้วจึงเทสารละลายเจลลงในถาดแม่พิมพ์ เสียบหวี (comb) สำหรับทำให้เกิดช่องสำหรับใส่ดีเอ็นเอลงไป ตั้งทิ้งจนกว่าเจลจะแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ให้เทสารละลาย 0.5X TBE ลงไปให้พอท่วมเจล ตั้งทิ้งไว้สักครู่ แล้วจึงดึงหวีออกในแนวตั้ง ระวังอย่าให้เจลทะลุ

นำผลผลิตของ PCR ออกมาจากเครื่องสังเคราะห์เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม เติมสี bromphenol blue 5 ไมโครลิตร ลงไปในส่วนผสมจากปฏิกิริยา PCR ของยีน RAGE ได้เลย แต่ส่วนผสมจากปฏิกิริยา PCR ของยีน β-actin ต้องนำมาเจือจางในสัดส่วน ดีเอ็นเอ:น้ำกลั่น:สี bromphenol blue เท่ากับ 2:5:5 ผสมดีเอ็นเอและสีให้เข้ากัน แล้วจึงปิเปตดีเอ็นเอลงไปในช่องสำหรับใส่ดีเอ็นเอบน 2 – 2.5% อะกาโรสเจลที่เตรียมไว้เมื่อครู่ และปิเปต 100 bp DNA ladder จำนวน 4 ไมโครลิตร เป็นอย่างสุดท้าย ทำการแยกผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟเรซิสที่

ศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45-60 นาที จากนั้น นำแผ่นเจลไปแช่ลงในสารละลาย ethidium bromide เพื่อย้อมดีเอ็นเอ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วจึงนำแผ่นเจลมาล้างในน้ำกลั่น นาน 15 นาที บันทึกภาพแผ่นเจลและวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ในเชิงปริมาณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป AlphaImager 2200 ระดับการแสดงออกของยีน RAGE จะถูกคำนวณในรูปสัดส่วนความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน RAGE ต่อความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน β–actin

<u>หมายเหตุ</u> สารละลาย ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง จึงต้องสวมถุงมือขณะใช้ทุกครั้ง

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D.) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มด้วยการวิเคราะห์ Student's *t*-test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsolf Office Excel 2003 และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยสำหรับหลายกลุ่มตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (Analysis of variance; ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (SPSS 11.5.0 for Windows) ค่า p ทั้งหมดที่ < 0.05 จะบ่งว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ