สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บรักษา *Streptomyces* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *Streptomyces* spp. D230704 และ O245704 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดิน ในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และได้เก็บรักษาไว้ที่คลังเชื้อของภาควุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Punkum, 2007)

3.1.1 การเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Soybean Agar)

ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ของ *Streptomyces* spp. และขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแบบเอียง (soybean agar slant) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5-7 วัน หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นการเจริญของสปอร์ จากนั้นนำไปเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเก็บในลักษณะนี้นาน 1-2 เดือน แล้วจึงนำออกมาถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ (Punkum, 2007)

3.1.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิด C4 เพื่อเก็บเกี่ยวสารเมแทบอไลต์

นำสปอร์ของ *Streptomyces* spp. ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มากระตุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด C4 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีขดลวดสปริงที่ก้นขวด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 xg นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาใช้ในการสกัดหรือเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด เขย่าเล็กน้อย เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดทดสอบฤทธิ์และใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Streptomyces*

3.2.1 การเลี้ยง *Streptomyces* เพื่อเก็บเกี่ยวสายใย

นำสปอร์ของ *Streptomyces* spp. ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มากระตุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด C4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีขดลวดสปริงที่ก้นขวด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 xg นาน 15 นาที เทส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้ง นำสายใยซึ่งตกตะกอนอยู่ก้นหลอดไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TE (ภาคผนวก ข) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 xg นาน 15 นาที เทสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TE ออก ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์เล็กน้อย 1X TE เพื่อแขวนลอยสายใย ถ่ายลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 xg นาน 15 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

3.2.2 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Song et al., 2004)

ชั่งสายใยเปียก 2 กรัม ลงในไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นละลายด้วย SET buffer (ภาคผนวก ข) 0.4 มิลลิลิตรและเติมเอนไซม์ lysozyme ปริมาตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากบ่มแล้วเติมสารละลาย 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด เติมเอนไซม์ protenase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาเบาๆ เป็นระยะ เพื่อผสมให้เข้ากัน 2-3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย 5M NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตรทั้งหมด และเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด เขย่าให้เข้ากันจนสังเกตได้ว่าเป็นสีขาวขุ่น ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 xg นาน 15 นาที สังเกตได้ว่าส่วนผสมแขวนลอยแยกออกเป็น 2 ชั้น ปิเปตต์ส่วนบนลงในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ผสมโดยการกลับหลอดไปมาช้าๆ แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 xg นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอลเย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 4,500 xg นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือนำไปปั่นเหวี่ยงที่เครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศนาน 7 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNase A (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 ไมโครกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอไปสกัดด้วย phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด เขย่าแรงๆให้เข้าเป็นเนื้อเดียว แล้วนำไปปั่นความเร็วรอบ 5,000 xg นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ปิเปตส่วนบนไปยังไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลบริสุทธิ์เย็นปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรทั้งหมดและสารละลาย 3M sodium acetate (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้บน

น้ำแข็งนาน 15 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือปั่นเหวี่ยงที่เครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศนาน 7 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S subunit of ribosomal DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

วัดปริมาณดีเอ็นเอและทำให้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 75-150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A (5'-AGAGTTGTCCTGGC TCAG-3') เป็น forward primer และไพรเมอร์ H (5'-AAGGAGGTGATC CAGCC GCCG CA-3') เป็น reverse primer (Rintala et al., 2001) องค์ประกอบของปฏิกิริยาแสดงในตาราง 3.1 หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 1,500 bp

ตาราง 3.1 องค์ประกอบของ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA

Reagent	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำบริสุทธิ์ TM Molecular biology Grade	-	10
EmmeraldAmp PCR Mastermix (Takara Bio, Jepan)	-	12.5
ไพรเมอร์ A (forward primer)	10 μM	0.5
ไพรเมอร์ H (reverse primer)	10 μM	0.5
จีโนมิคดีเอ็นเอ	75-150 ng/μl	2
ปริมาตรสุทธิ		25

สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นดังนี้ ;

Hot start	95	องศาเซลเซียส	นาน	5	นาที	
Denaturing	94	องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที	30 รอบ
Annealing	53	องศาเซลเซียส	นาน	1.20	นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที	
Final extension	72	องศาเซลเซียส	นาน	10	นาที	

3.2.4 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล

แยกผลิตภัณฑ์ PCR ในอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Germany) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ตรงบริเวณของดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการโดยสังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องฉายรังสียูวี นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดแล้วใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (1 ไมโครลิกรัม = 1 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด จากนั้นปิเปตสารละลายทั้งหมดลงใน QIAquick column โดยปริมาตรต้องไม่เกิน 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,870 xg นาน 1 นาที เทส่วนใสในคอลัมน์ด้านล่างทิ้ง หากยังมีสารละลายในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เหลืออยู่ให้ปิเปตต์ลงใน QIAquick column และทำตามขั้นตอนเดิมจนกว่าสารละลายจะหมด หลังจากเทส่วนใสทิ้งในครั้งสุดท้ายแล้วให้นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเดิมอีกครั้ง ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,870 xg นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่ยังเหลืออยู่ ย้ายคอลัมน์บนมายังหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของคอลัมน์เพื่อชะดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,870 xg นาน 1 นาที สารละลายดีเอ็นเอจะอยู่ในส่วนของหลอดเซนตริฟิวจ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วย 2% อะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟรีซิส นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA

ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส (ดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA) ที่แยกจากอะกาโรสเจลไปวิเคาระห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัทวิเคาะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (1st BASE, Singapore) โดยใช้ primer A (5'-AGAGTTGTCCTGGCTCAG-3') เป็น forward primer และ primer H (5'-AAGGAGGTGAT CCAGCCGCCGCA-3'), primer strepE (5'-CACCAGGAATTCCGATCT-3') และ primer strepF (5'-ACGTGTGCAGCCCAAGACA-3') เป็น reverse primer จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA เทียบกับฐานข้อมูล (Genbank® database)

3.3 การทำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Streptomyces* spp. D230704 และ O245704 ให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์

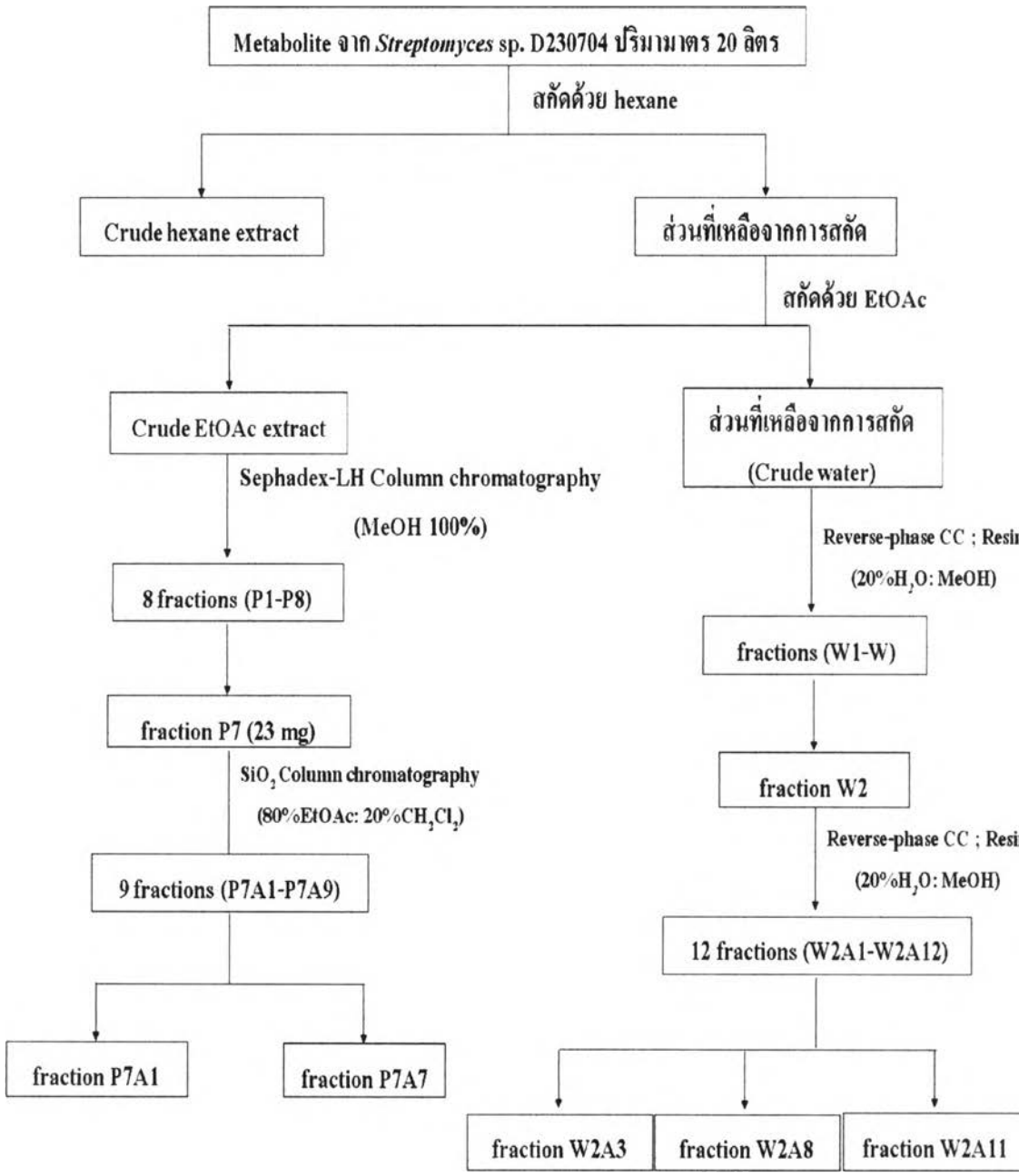
3.3.1 การสกัดและการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. D230704 และ O245704 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว C4 เก็บเกี่ยวส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 xg เก็บส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการคัดกรองสาร ขั้นตอนในการคัดกรองสารดำเนินการตามแผนภูมิ 1 และ 2 ตามลำดับ ดังนี้ เพิ่มปริมาณการผลิตในการเก็บเกี่ยวน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* spp. D230704 และ O245704 ให้มีปริมาตร 20 ลิตร ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Streptomyces* sp. O245704 ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย hexane และ ethyl acetate ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่สกัดหยาบที่อยู่ใน ethyl acetate (crude ethyl acetate) ไปผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 column ขนาด 3.8 × 5 เซนติเมตร ใช้เมทานอลเป็นสารละลายในการชะผ่านคอลัมน์ (ภาคผนวก ข) จากการผ่านคอลัมน์ของสารสกัดได้แบ่งสารสกัดออกเป็น 8 ส่วน คือ P1 ถึง P8 นำแต่ละส่วนของสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยการวิเคราะห์ด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) (ภาคผนวก ข) และนำไปวิเคราะห์ ^{1}H NMR spectrum (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำสารสกัดทุกส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (หัวข้อ 3.4.2) และทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบโดยวิธีการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ (หัวข้อ 3.4.3) จากนั้นนำส่วนของสารสกัด P7 มาผ่าน silica gel column chromatography ทำให้ได้สารที่ทำให้บริสุทธิ์ 9 ส่วน คือ P7A1 ถึง P7A9 นำแต่ละส่วนของสารสกัดที่แยกได้ไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC นำสารสกัดทุกส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (หัวข้อ 3.4.2) แลทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบโดยวิธีการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ (หัวข้อ 3.4.3) เช่นกัน

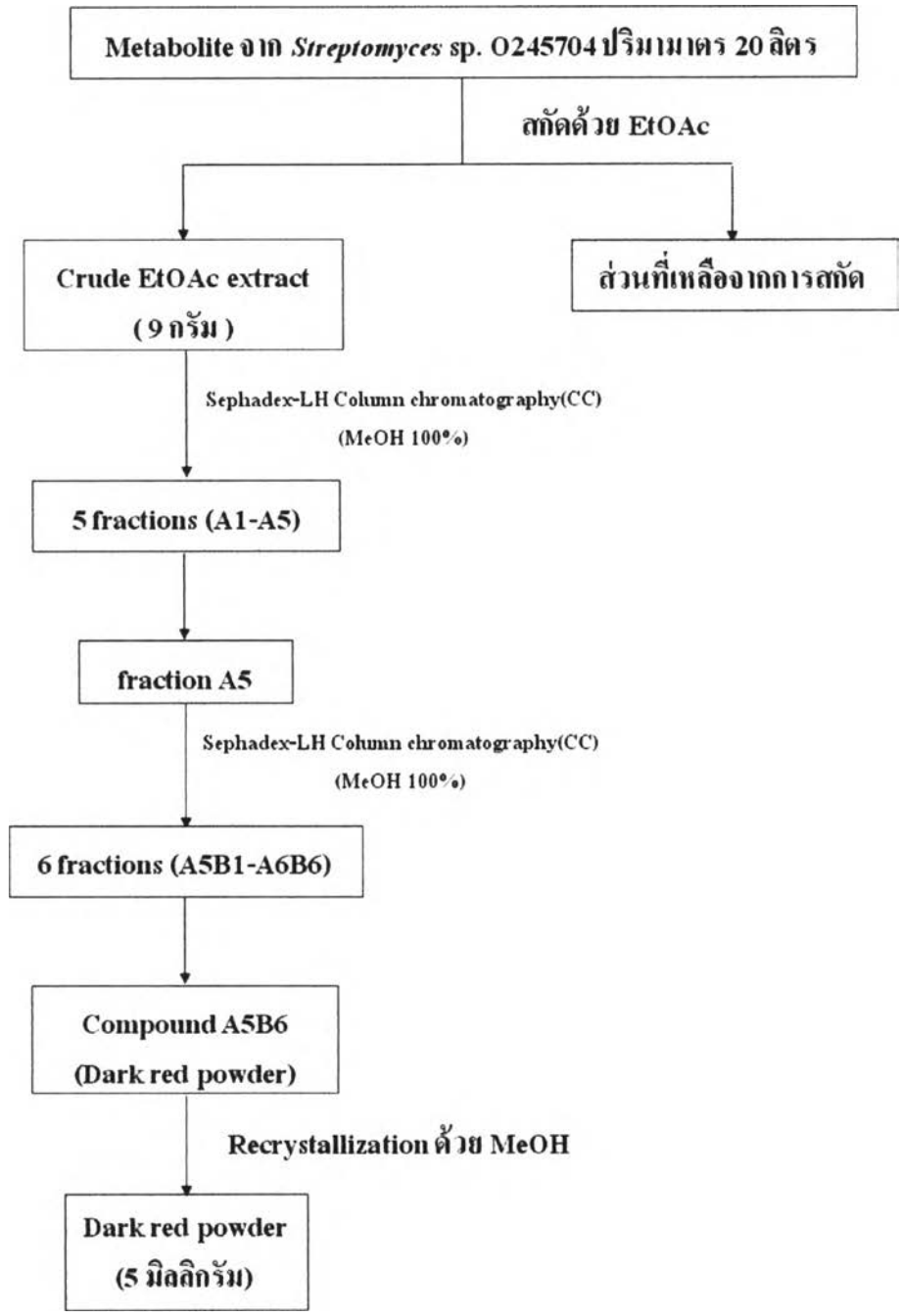
ในส่วนของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย hexane นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (หัวข้อ 3.4.2) และความสามารถในการต้านการอักเสบโดยวิธีการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ (หัวข้อ 3.4.3) ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหลือจากการสกัดด้วย ethyl acetate และ hexane (water crude) ในชั้นของน้ำ นำไปผ่าน reverse phase silica gel column chromatography (ภาคผนวก ข) ซึ่งจะได้สารที่ทำให้บริสุทธิ์ 8 ส่วน คือ W1 ถึง W8 นำแต่ละส่วนของสารสกัดไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และ ^{1}H NMR spectrum นำสารสกัดทุกส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (หัวข้อ 3.4.2) และทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบโดยวิธีการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ (หัวข้อ 3.4.3) เลือกส่วนของสารสกัด W2 ไปผ่าน reverse phase silica gel column chromatography จากการผ่านคอลัมน์ทำให้ได้สารที่ทำให้บริสุทธิ์ 12 ส่วน คือ W2A1 ถึง W2A12 นำสารทั้ง 12 ส่วนที่ได้มาทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC นำสารสกัดทุก

ส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (หัวข้อ 3.4.3) และคัดกรองความสามารถในการต้านการอักเสบโดยวิธีการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ (หัวข้อ 3.4.3)

สำหรับ *Streptomyces* sp. O230704 สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate นำสารสกัดที่สกัดได้ไปผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 column ขนาด 3.8 × 5 เซนติเมตร (ภาคผนวก ข) ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการชะผ่านคอลัมน์ จากการผ่านคอลัมน์ของสารสกัดได้แบ่งสารสกัดออกเป็น 6 ส่วน คือ A1 ถึง A6 นำแต่ละส่วนของสารสกัดไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย TLC นำสารสกัดทุกส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (หัวข้อ 3.4.2) และทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบโดยวิธีการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ (หัวข้อ 3.4.3) เลือกส่วนของสารสกัด A6 เนื่องจากสารสกัดส่วนย่อย A6 มีฤทธิ์ในการกดการผลิตไนตริกออกไซด์ในการอักเสบและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ ไปผ่านคอลัมน์ชนิด Sephadex LH-20 column ขนาด 3.8 × 5 เซนติเมตร (ภาคผนวก ข) ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการชะผ่านคอลัมน์ นำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (หัวข้อ 3.4.2) และความสามารถในการต้านการอักเสบโดยวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ (หัวข้อ 3.4.3) เพื่อยืนยันความสามารถในการต้านการอักเสบของสาร และพิสูจน์ทราบโครงสร้างโครงสร้างของสารโดย NMR และวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารด้วยเครื่อง Mass spectrometer (MS) ชนิด MOLDI-TOF mass spectrometry (ภาคผนวก ข)



แผนภูมิ 1 ขั้นตอนการสกัดสารและคัดแยกสารของเมแทบอไลต์จาก *Streptomyces* sp. D230704



แผนภูมิ 2 ขั้นตอนการสกัดสารและคัดแยกสารของเมแทบอไลต์จาก *Streptomyces* sp. O245704

3.4 เซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ คือ เซลล์ไลน์แมโครฟาจของหนูไมซ์ RAW 264.7 ATCC No.TIB-71 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่เติมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) (ภาคผนวก ก) เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด non-tissue culture treated ภายใต้ภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.1 การเก็บรักษาเซลล์ RAW 264.7

เก็บเซลล์ไลน์ RAW 264.7 โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM สำหรับแช่แข็ง (DMEM freezing media) (ภาคผนวก ก) ที่เติม 10% DMSO (v/v) ที่เย็นปริมาตร 1 ไมโครลิตร ย้ายเซลล์ลงในหลอด cryogenic ที่เย็นเช่นกัน นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เก็บไว้อย่างน้อยนาน 1 คืน เพื่อการเก็บรักษาในเวลานานย้ายหลอดเก็บเซลล์ไปในไนโตรเจนเหลว

3.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารโดยวิธี MTT

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธี MTT assay ทำได้โดยใช้เซลล์ไลน์ RAW 264.7 จำนวน $5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรในจานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ในปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 คืนในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ แบ่งการทดลองเป็นชุดทดสอบและชุดควบคุม (ชุดละ 3 ซ้ำ) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ในชุดทดสอบเติมอาหารใหม่ที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบอยู่ และชุดควบคุมเติมอาหารใหม่ที่มีตัวทำละลายของสารทดสอบในปริมาตรเท่ากับปริมาตรสูงสุดของปริมาตรของสารทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมงที่สภาวะเดิม ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเบาๆ ละลายตะกอน formazan ด้วยสารละลาย 0.4 N HCl isopropanol (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงจนตะกอนละลายหมด นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Biochrom, England) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ (%cell viability) คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{เปอร์เซนต์ความอยู่รอดของเป็นพิษต่อเซลล์ (\%cell viability)} = \frac{\text{(OD test-OD blank)}}{\text{OD control -OD blank}} \times 100$$

หมายเหตุ ODtest คือ ค่าดูดกลืนแสงของการทดลองชุดทดสอบ

ODblank คือ ค่าดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย MTT 10 ไมโครลิตร และสารละลาย 0.4 N HCl isopropanol 100 ไมโครลิตร

ODcontrol คือ ค่าดูดกลืนแสงของการทดลองชุดที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีตัวทำละลายของสารทดสอบ

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการวัดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์

ความสามารถในการต้านการอักเสบของเมแทบอไลต์วิเคราะห์จากการวัดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ของปฏิกิริยาการกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจด้วยปฏิกิริยา Griess ซึ่งทำได้โดยใช้เซลล์ไลน์ RAW 264.7 จำนวน $5x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ที่อยู่ในปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในจานหลุม 96 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดซ์ออกไซด์ เป็นเวลา 1 คืน แบ่งการทดลองเป็นชุดทดสอบและชุดควบคุม (ชุดละ 3 ซ้ำ) หลังจากครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเติมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดการทดลองชุดทดสอบและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในชุดทดสอบที่เป็นชุดควบคุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นในชุดทดสอบเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดทดสอบเท่าเดิมปริมาตร 50 ไมโครลิตรและกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้นสุดท้ายต่อหลุม 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และ IFN-γ ความเข้มข้นสุดท้ายต่อหลุม 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) (ปริมาตรรวมอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับชุดควบคุมเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวทำละลายในปริมาตรเท่ากับปริมาตรสูงสุดของสารทดสอบกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ ความเข้มข้นเดียวกับชุดทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดซ์ออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาบ่มเตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย nitrite (ภาคผนวก ข) ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0 ตามลำดับ ปรับให้มีปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร (ชุดละ 3 ซ้ำ) ทำในจาน 96 หลุม จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในชุดทดลองและชุดควบคุมมาหลุมละ 50 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยง 96 หลุม เติมสารละลาย sulfanilamide (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติมสารละลาย NED (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Biochrom, England) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณตามสมการ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (\% inhibition against nitric oxide production)} = \frac{\text{(NO test-NO min)}}{\text{OD max -OD min}} \times 100$$

หมายเหตุ ODtest คือ ค่าดูดกลืนแสงของการทดลองชุดทดสอบ และกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ

ODmax คือ ค่าดูดกลืนแสงของการทดลองชุดที่ได้ระบการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ

ODmin คือ ค่าดูดกลืนแสงของการทดลองชุดที่ไม่ได้ระบการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ

3.5 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี Western blot

3.5.1 การสกัดโปรตีนจากเซลล์

เลี้ยงเซลล์ไลน์ RAW 264.7 ลงในจาน 24 หลุม จำนวน $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดซ์ออกไซด์ เป็นเวลา 1 คืน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบ ในปริมาตร500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดซ์ออกไซด์ นาน 1 ชั่วโมง ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมหารหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบและกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้นสุดท้ายต่อหลุม 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และ IFN-γ ความเข้มข้นสุดท้ายต่อหลุม 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ในปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มตามเวลาที่กำหนด ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่เย็น(ภาคผนวก ก) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นดูดบัฟเฟอร์ 1X PBS ทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ A (ภาคผนวก ข) บนน้ำแข็ง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตบัฟเฟอร์ A ออกเช่นกัน สกัดเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ B (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตรดูดขึ้นลงให้ทั่วหลุม ย้ายสารสกัดโปรตีนไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เขย่าหลอดด้วย vortex นาน 10 วินาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปิเปตส่วนใสบนไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.2 การวิเคาะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

นำตัวอย่างโปรตีนสกัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็ง เมื่อโปรตีนละลายแล้วนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ชุด BCA protein assay kit หลักการและขั้นตอนดำเนินการตามบริษัทผู้ผลิตดังนี้ การเตรียม reagent จะทำการผสมระหว่าง reagent A reagent B ในอัตราส่วน reagent A: reagent B (50: 1) และเตรียมโปรตีนมาตรฐานเพื่อใช้ทำกราฟ

ความเข้มข้นโปรตีนมาตรฐาน (standard curve) ในการเปรียบเทียบกับโปรตีนตัวอย่าง ใช้ Bovine serum albumin (BSA) ในการเตรียมโดยเตรียม BSA ให้มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในจาน 96 หลุม ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเจือจางโปรตีนตัวอย่างลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ทำ 2 ซ้ำ) ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ไมโครลิตร ลงในจาน 96 หลุม เติม reagent ที่เตรียมไว้ลงในหลุมตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำไปวัดด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ค่าดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

3.5.3 Western blot

เตรียมเจล SDS-polyacrylamide ตามภาคผนวก ข หัวข้อ 12-15 วัดปริมาณโปรตีนและทำให้เจือจางโดยให้ปริมาณโปรตีนมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 30-60 ไมโครกรัม ผสมโปรตีนที่ทำการเจือจางแล้วกันสารละลายบัฟเฟอร์ 2X Laemmli (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาตรโปรตีน นำโปรตีนไปทำให้เสียสภาพที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในกล่อง heat box และใส่ใน SDS-polyacrylamide ที่เตรียมไว้ ด้วยเครื่อง Protein III system (Bio-Rad, USA) นำโปรตีนที่ทำให้เสียสภาพแล้วไปโหลดลงหลุมของเจล SDS-polyacrylamide ที่เตรียมไว้โดยให้ 1 หลุมเป็น molecular weight marker ใส่ตัวอย่างในปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นปรับโปรแกรมเครื่อง Protein III system ให้ปริมาณกระแสไฟฟ้าอยู่ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำเจลออกใส่ไว้ในบัฟเฟอร์สำหรับโอนถ่าย ตัดเมมเบรน PVDF (GE Healthcare, USA) และกระดาษกรอง ให้มีขนาดเท่ากับขนาดของเจล นำไปใส่ในบัฟเฟอร์ transfer (ภาคผนวก ข) นำเจลไป transfer ด้วยเครื่อง Transfer-Blot® SD (Bio-Rad, USA) โดยวางกระดาษกรอง 3 แผ่น แล้ววางเจลลงบนกระดาษกรอง จากนั้นวางเมมเบรนและวางกระดาษกรองอีก 3 แผ่นบนแมนเบรน จัดให้เรียงอยู่ในแนวเดียวกัน กำจัดฟองอากาศด้วยการกลิ้งหลอดแล้วไปในทางเดียวกัน 3 ครั้ง บนกระดาษกรองแผ่นบนสุด โดยไม่ให้อุปกรณ์ทั้งหมดขยับ จากนั้นปิดฝาเครื่อง แล้วปรับเครื่องให้มีค่าแอมแปร์ที่ 90 แอมแปร์ นาน 90 นาทีต่อ 1 เจล เมื่อครบเวลา นำเมมเบรนไปใส่ในสารละลาย blocking นาน 5 นาที 2 ครั้ง บนเครื่อง rocker (Labnet International Inc, USA) ย้ายแผ่นเมนเบรนไปบ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิ ที่ทำการเจือจางในสารละลาย blocking ตามความเข้มข้นตามตาราง 3.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที แล้วนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 60 นาที เทแอนติบอดีปฐมภูมิทิ้ง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1X PBST (ภาคผนวก ข) นาน 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 2 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ทำให้เจือจางใน

สารละลาย blocking (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นในอัตราส่วนแอนติบอดีทุติยภูมิตามตาราง 3.2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที เทแอนติบอดีทุติยภูมิทิ้ง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1X PBST นาน 5 นาที 2 ครั้ง ตามด้วย 15 นาที 2 ครั้ง (แอนติบอดีทุติยภูมิที่ใช้จะติดฉลากด้วย horseradish peroxidase; HRP) (Amersham Biosciences, England) นำไปวัดสัญญาณการแสดงออกของโปรตีนด้วย chemiluminesence และ autoradiography

ตาราง 3.2 อัตราส่วนความเข้มข้นของแอนติบอดีปฐมภูมิ

แอนติบอดี	อัตราส่วนความเข้มข้นที่ใช้	ระยะเวลาในการประกบฟิล์ม
Mouse anti-β-actin Ab*	1: 10,000	5 วินาที
Rabbit anti-iNOS Ab*	1: 2,000	5 นาที
Rabbit anti-phospho-p65 Ab*	1: 4,000	3 นาที
Rabbit anti-total-p65 Ab*	1: 4,000	3 นาที
Rabbit anti-phospho-SAPK/JNK Ab*	1: 4,000	5 นาที
Rabbit anti-total- SAPK/JNK Ab*	1: 4,000	5 นาที
Rabbit anti-phospho-p44/42 Ab*	1: 4,000	1 นาที
Rabbit anti-total- p44/42 Ab*	1: 4,000	1 นาที
Rabbit anti-phospho-p38 Ab*	1: 4,000	10 นาที
Rabbit anti-total-p38 Ab*	1: 4,000	10 นาที
Rabbit anti-phospho-IKBα Ab*	1: 4,000	10 นาที
Mouse anti-total-IKBα Ab*	1: 4,000	10 นาที
Sheep anti-mouse-HRP Ab**	1: 5,000	-
Donkey anti-rabbit-HRP Ab**	1: 4,000	-
Goat anti-rabbit-HRP Ab*	1: 4,000	-

หมายเหตุ * จากบริษัท Cell signaling Technology® (MA) และ ** จากบริษัท Amersham Biosciences (UK)

3.5.4 การตรวจวัดสัญญาณ chemiluminesence ด้วยวิธี autoradiography

การตรวจวัดสัญญาณด้วยวิธี chemiluminesence และ autoradiography ทำได้โดยเตรียมในสัดส่วนผสมของสารละลายบัฟเฟอร์ A และสารละลายบัฟเฟอร์ B (ภาคผนวก ข) และเติมลงบนเมมเบรน PVDF ที่ต้องการวิเคราะห์ บ่มเป็นเวลา 1-2 นาที บนเครื่อง rocker นำฟิล์ม high performance chemiluminesence วางลงบนเมมเบรน จับเวลา นำฟิล์มล้างด้วยน้ำยาสำหรับล้างฟิล์ม

I 37537725

เขย่าเบาๆ นาน 30 วินาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบสัญญาณ นำไปล้างด้วยน้ำ จากนั้นนำฟิล์มลงไปในน้ำยาสำหรับ fix เป็นเวลาประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำอีกครั้ง จากนั้นนำไปทำให้แห้ง (air dried) แล้วนำเมมเบรนล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1X PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง ตามด้วย 15 นาที 2 ครั้ง แล้วจึงนำไปจับกับแอนติบอดีตัวอื่นต่อไป

3.6 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA

3.6.1 การสกัด total RNA

เลี้ยงเซลล์ไลน์ RAW 264.7 ลงในจาน 24 หลุม จำนวน $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดซ์ออกไซด์ เป็นเวลา 1 คืน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบ ในปริมาตร500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดซ์ออกไซด์ นาน 1 ชั่วโมง ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมหารหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบและกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้นสุดท้ายต่อหลุม 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และ IFN-γ ความเข้มข้นสุดท้ายต่อหลุม 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ในปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มตามเวลาที่กำหนด เมื่อครบเวลาการเลี้ยงเซลล์ กำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์โดยปิเปตส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง สกัด RNA ของเซลล์ด้วย TRIzol® reagent ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ดูด reagent ขึ้นลงให้ทั่วหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ย้าย lysate ลงไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม chloroform ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อ TRIzol® 1 มิลลิลิตร หรือ 500 ไมโครลิตร เขย่าหลอดแรงๆด้วยมือ นาน 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x□g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่นเหวี่ยงสารละลายผสมจะแยกชั้นโดยชั้นล่างที่มีสีแดงจะเป็นชั้นของ phenol–chloroform และชั้นบนที่ไม่มีสีจะเป็นชั้นที่มี RNA อยู่ให้ดูดส่วนบนไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ (400-450 ไมโครลิตร สำหรับ TRIzol® 1 มิลลิลิตร และ 200-250 ไมโครลิตร สำหรับ TRIzol® 500 ไมโครลิตร) ตกตะกอน RNA ด้วย isopropanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (หรือ 500 ไมโครลิตร) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร (หรือ 500 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและปล่อยให้ RNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-10 นาที เติมน้ำ DEPC-treated ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไป RNA ไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

วัดปริมาณ RNA ด้วยโดยใช้เครื่อง NanoDrop ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ของบริษัทผู้ผลิต ในการสังเคราะห์ cDNA ปิเปต random hexamer (Qiagen, Germany) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ลงในหลอด PCR เติม RNA 0.5-1 ไมโครกรัม และปรับปริมาตรของปฏิกิริยาโดยใช้น้ำ DEPC treated ที่ปลอดเชื้อให้เป็น 12.5 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากบ่มแล้วนำไปวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วจึงเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงในตาราง 3.3

ตาราง 3.3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาสังเคราะห์ cDNA

Reagent	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X RT buffer*	1X	4
dNTP mix**	1 mM	2
RNase Inhibitor*	20 U/reaction	0.5
reversase transcriptase*	200 U/reaction	1
Total volume		7.5

หมายเหตุ * บริษัทผู้ผลิต Fermentus, Canada, ** บริษัทผู้ผลิต Qiagen, Germany

โดยสภาวะการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA เป็นดังนี้

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

โดยการสังเคราะห์จะใช้ด้วยเครื่อง Bioer Life Express (Bioer technology, China) เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.6.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรสชนิดวัดตามปริมาณตามเวลาจริง (Quantitative real-time PCR, qPCR)

นำส่วนประกอบของปฏิกิริยาหมดในตาราง 3.4 ใส่ลงในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยา จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง โดยอุณหภูมิของปฏิกิริยาและจำนวนรอบของปฏิกิริยาตามตาราง 3.5 ด้วยเครื่อง MJ Mini personal Thermal cycler (Biorad, USA)

ตาราง 3.4 องค์ประกอบของ qPCR

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Molecular biology Grade water	-	9
SYBR green (BioRAD)	-	12.5
primer A (forward primer)	10 µM	0.75
primer H (reverse primer)	10 µM	0.75
cDNA	0.5-1 ng/µl	2
Total volume		25

ตามสภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้

Hot start	95	องศาเซลเซียส	นาน	10	นาที	
Denaturing	95	องศาเซลเซียส	นาน	5	นาที	} Y รอบ
Annealing	X	องศาเซลเซียส	นาน	30	นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที	
Final extension	72	องศาเซลเซียส	นาน	10	นาที	

ตาราง 3.5 อุณหภูมิสำหรับการอะนิวลิง (X) และจำนวนของรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรส (Y) ชนิดวัดปริมาณตามเวลาจริง

ไพรเมอร์	อุณหภูมิสำหรับการอะนิวลิง (องศาเซลเซียส)	จำนวนรอบของปฏิกิริยา (รอบ)
m*β-actin*	55	40
m*iNOS*	60	40
m*TNFα*	55	40
m*IL-6*	52	40
m*IL-10*	58	45

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของข้อมูลมาจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistics รุ่น 19 วิเคราะห์ความแตกต่างแบบ t-test จากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม ค่าสถิติที่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P value < 0.05