บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

-20 °C Freezer	SANYO
-80 °C Freezer	IlShin Lab Co.,Ltd
12 Well Cell Culture Cluster Flat Bottom with Lid	Corning Incorporation
24 Well Cell Culture Cluster	Corning Incorporation
6 Well Cell Culture Cluster Flat Bottom with Lid	Corning Incorporation
96 Well Cell Culture Cluster Flat Bottom with Lid	Corning Incorporation
Absorbance Photometer	Anthos
Analytical balances	METTLER TOLEDO
Barrier tips (20, 100, 1000 µl)	CLP
Block Heater	Wealtec Corp.
Camera hood and control unit	UVItec
Cell culture dish (60 x 15 mm, 100 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

High Intensity Ultrasonic Processor	SONICS
Inverted microscope	Olympus
Larminar Flow Cabinet	FLUFRANCE
Light microscope	Olympus
Liquid Nitrogen Refrigerator	TAYLOR-WHARTON
Lyophilyzer	Savant
Membrane filter	Gelmansciences
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
Microscrope slide (25.4 x 76.2 mm (1"x3") thick 1-1.2mm)	sail brand
Pipet Aids	Jencons (scientific) LTD
Pipette tips (10, 200, 1000 µl)	Sorenson BioScience, Inc.
Pipettes	GILSON
Power supply	Biorad
UV-visible spectrophotometry	SHIMADZU
Rotary evaporators	Heidolph Instruments
Sterile syringes filter	Corning Incorporation
Submarine/Horizontal Gel Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Thermal cycler	ThermoHybrid
Ultraviolet Transilluminators	UVItec Limited
Vacuum regulator	SHAF®
Vortex Mixer	FINEPCR
Water bath	Memmert
Whatman no.1 Filter paper	Whatman Limited
Whatman no.4 Filter paper	Whatman Limited

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

100 bp DNA Ladder	Fermentas
100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Fermentas
Agarose gel	ISC BioExpress
β-actin primers	Invitrogen
Boric acid	VWR international Ltd
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
Chloroform	Merck
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Amresco
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
DNase I	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	HyClone
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	JRH Biosciences
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	VWR international Ltd.
Eosin solution	C.V. Laboratories co., LTD
Ethanol	Merck
Ethidium bromide	Sigma
Fetal bovine serum	HyClone
Folin ciocalteau reagent	Carlo Erba
Fungizone Amphotericin B	Invitrogen
Gallic acid	Fluka
GAPDH primers	Invitrogen
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	Promega
Isopropanol	Sigma
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	Becton Dickinson Labware
Methanol	J.T. Baker
Modified Haematoxylin solution	C.V. Laboratories co., LTD
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	J.T. Baker

Sodium hydroxide (NaOH)	Carlo Erba
SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase	Invitrogen
Oligo dT(17) primer	Bioservice unit (BSU)
Penicillin-Streptomycin Solution	HyClone
RAGE primers	Bioservice unit (BSU)
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen
RNase Away	CLP
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
Sucrose	Ajax Finechem
Tris base	Promega
TRIZOL® Reagent	Invitrogen
Trypan blue stain	Gibco
Trypsin	HyClone

3.2 แอปเปิ้ลที่ใช้ในการทดลอง

แอปเปิ้ลที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นพันธุ์ Red Delicious ดังภาพที่ 10 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีการรายงานว่ามีค่าโพลีฟีนอลอยู่ในระดับที่สูง และมีผู้นำแอปเปิ้ลพันธ์นี้มาใช้ในการทดลองกันอย่างแพร่หลาย โดยผู้ทำการทดลองได้ทำการซื้อมาจากปากคลองตลาด (กรุงเทพมหานคร) ซึ่งในการสกัดและทำการทดลองนั้นจะทำการวิเคราะห์ผลแยกกันระหว่างเปลือกของผลแอปเปิ้ลและเนื้อของผลแอปเปิ้ล ทั้งนี้เนื่องมาจากทั้ง 2 ส่วนต่างก็มีส่วนประกอบของสารโพลีฟีนอลในอัตราส่วนที่ต่างกัน โดยก่อนการทดลองนั้น แอปเปิ้ลที่นำมาใช้จะต้องนำมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด ผึ่งไว้ให้แห้งก่อนที่จะนำมาปอกเปลือก แบ่งเนื้อแอปเปิ้ลออกเป็น 4-6 ส่วน และแยกแกนกับเมล็ดของแอปเปิ้ลทิ้งไป โดยในขั้นตอนของการสกัดนั้นจะทำการสกัดแยกระหว่างเปลือกและเนื้อของแอปเปิ้ล

ภาพที่ 11 : **แอปเปิ้ลพันธ์** Red Delicious **ที่นำมาใช้ในการทดลอง**

3.3 การสกัดสารโพลีฟีนอลจากแอปเปิ้ล

ในการสกัดสารโพลีฟีนอลจากแอปเปิ้ลนั้น เนื่องจากโพลีฟีนอลเป็นสารที่สลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนอากาศจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้สารออกฤทธิ์จำพวกโพลีฟีนอลเกิดการเสื่อมสภาพ ดังนั้นสถานที่ที่ทำการสกัดนั้นจะต้องห่างไกลจากแสงให้มาก ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำในขณะที่ทำการสกัด ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการเตรียมการล่วงหน้า โดยก่อนวันที่จะทำการสกัดแอปเปิ้ลนั้นให้นำวัสดุอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็นต้องใช้ในขั้นตอนการสกัด เช่น บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ และสารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลายต่างๆมาเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยในการวิจัยนี้ได้ทดลองวิธีการสกัดแอปเปิ้ลทั้งหมด 3 วิธีด้วยกัน ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นการสกัดอย่างหยาบ ทั้งนี้เพื่อหาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้สารโพลีฟีนอลที่ดีที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.1 วิธีการสกัดแบบที่ 1 (Leontowicz et al., 2003)

ในวิธีนี้ตัวทำละลายที่ใช้คือสารละลาย 90% เอธานอล ทำการสกัดโดยแยกแอปเปิ้ลออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือ ส่วนของเปลือก และส่วนของเนื้อแอปเปิ้ล แบ่งเนื้อแอปเปิ้ล ออกเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำแอปเปิ้ลที่ได้ไปผสมเข้ากับ 90% เอธานอล ด้วยอัตราส่วนดังต่อไปนี้ คือ เนื้อแอปเปิ้ล 1 กรัม จะใช้ตัวทำละลาย 90% เอธานอล 0.7 มิลลิลิตร ส่วนเปลือกแอปเปิ้ล 1 กรัมจะใช้ตัวทำละลาย 90% เอธานอล 1.2 มิลลิลิตร และทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดอาหาร กรองเศษแอปเปิ้ลที่เหลือออกมาด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 และเบอร์ 1 ตามลำดับ เพื่อแยกส่วนที่เป็นน้ำสีเหลืองใสออกจากกากแอปเปิ้ล นำกากแอปเปิ้ลที่แยกได้ไปทำการสกัดด้วย 90% เอธานอลด้วยวิธีที่เหมือนข้างต้น โดยทำตามขั้นตอนดังกล่าวทั้งหมด 5 ครั้ง นำน้ำสีเหลืองใสที่ได้จากการสกัดทั้งหมดมารวมกันในขวดรูปชมพู่ที่ห่อกระดาษฟอยล์ ก่อนที่จะนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส รอการระเหยแห้งเพื่อเอาตัวทำละลายออกในขั้นต่อไป

3.3.2 **วิธีการสกัดแบบที่** 2 (Van Der Sluis et al., 2002)

ในวิธีนี้ตัวทำละลายที่ใช้คือสารละลาย 90% เอธานอล ทำการสกัดโดยแยกแอปเปิ้ลออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือ ส่วนของเปลือก และส่วนของเนื้อแอปเปิ้ล แบ่งเนื้อแอปเปิ้ล ออกเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำแอปเปิ้ลทั้ง 2 ส่วนไปผ่านไนโตรเจนเหลวเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากนั้นนำแอปเปิลทั้ง 2 ส่วน (ส่วนของเนื้อและเปลือกแอปเปิ้ล) ไปผ่านขั้นตอนของการเตรียมสารให้แห้งโดยใช้ความเย็นแบบสุญญากาศ (Lyophilyzation) เพื่อระเหิดเอาน้ำออกจากส่วนของแอปเปิ้ลให้หมดเป็นเวลา 3 วัน (ในกรณีที่ไม่สามารถนำแอปเปิ้ลที่ผ่านไนโตรเจนเหลวไปทำการระเหิดเอาน้ำออกด้วยเครื่อง Lyophilyzer ในทันที ให้เก็บส่วนของแอปเปิ้ลนั้นไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส) จดบันทึกน้ำหนักที่ได้ นำส่วนของแอปเปิ้ลที่ได้ไปผสมเข้ากับ 90% เอธานอลด้วยอัตราส่วนแอปเปิ้ลที่ต้องการนำมาสกัด 1 กรัมต่อ 90% เอธานอล 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำการ sonicate ด้วยเครื่อง High Intensity Ultrasonic Processor เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองส่วนที่ได้จากการสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำน้ำสีเหลืองใสที่ได้จากการสกัดทั้งหมดมารวมกันในขวดรูปชมพู่ที่ห่อกระดาษฟอยล์ ก่อนที่จะนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส รอการระเหยแห้งเพื่อเอาตัวทำละลายออกในขั้นต่อไป

3.3.3 **วิธีการสกัดแบบที่** 3 (Tsao et al., 2003)

ในวิธีนี้ตัวทำละลายที่ใช้คือสารละลาย 100% เมธานอล ทำการสกัดโดยแยก แอปเปิ้ลออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือ ส่วนของเปลือก และส่วนของเนื้อแอปเปิ้ล แบ่งเนื้อแอปเปิ้ล ออกเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำแอปเปิ้ลทั้ง 2 ส่วนไปผ่านไนโตรเจนเหลว ชั่งน้ำหนักของส่วนของแอปเปิ้ลที่ต้องการสกัด แล้วทำการจดบันทึกไว้เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาตรของเมธานอลที่ใช้ในการสกัด โดยปริมาตรสัดส่วนของเมธานอล ต่อ ส่วนของแอปเปิ้ลที่นำมาสกัดคือ 1:1 (w/v ratio) เมื่อคำนวณได้สัดส่วนที่ถูกต้องแล้ว ให้เทส่วนของแอปเปิ้ลที่ต้องการสกัด ลงไปผสมให้เข้ากันกับตัวทำละลายเมธานอลโดยใช้เครื่องบดละเอียดที่ผ่านการแช่เย็น กรองส่วนของแอปเปิ้ลที่ได้จากการปั่นละเอียดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกน้ำส่วนใสที่ได้จากการสกัดออกจากกากแอปเปิ้ล จากนั้นนำกากของแอปเปิ้ลที่เหลือ ไปทำการปั่นละเอียดด้วยเมธานอลอีกครั้งด้วยปริมาตรที่เท่าเดิม ทำเช่นนี้ไปจนครบ 5 ครั้ง เป็นที่น่าสังเกตว่ากากแอปเปิ้ลที่ได้จากการปั่นในรอบหลังๆ จะ

เริ่มเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาว ส่วนน้ำที่ได้จากการกรองก็จะเหลืองใส ต่างจากที่ได้ในรอบแรกๆที่จะมีสีเหลืองเข้มมาก เมื่อทำการสกัดเรียบร้อยจนครบทั้ง 5 ครั้งแล้ว ให้นำน้ำเหลืองใสที่ได้จากการสกัดมารวมกันในขวดรูปชมพู่ที่ห่อกระดาษฟอยล์ก่อนที่จะนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส รอการระเหยแห้งเพื่อเอาตัวทำละลายออกในขั้นต่อไป

3.4 การกำจัดตัวทำละลายออกจากสารสกัดแอปเปิ้ล

เพื่อนำไประเหยเอาตัวทำละลาย 90% เอธานอลออกด้วยเครื่อง evaporator ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจนกว่าจะระเหยเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัดแอปเปิ้ลไปจนหมด ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และทำการจดบันทึกเก็บไว้ จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดรูปชมพู่ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบในขั้นต่อไป

3.5 การวัดค่าโพลีฟีนอล (ALNICOLSA del Perú S.A.C., 2007)

วัดปริมาณของสารโพลีฟีนอลโดยรวม (total polyphenol) ที่ได้ตามหลักการของ Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิค (gallic acid) เป็นสารมาตรฐานโดยเจือจางเป็นความเข้มข้นที่ต่างกัน ซึ่งสารตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบเพื่อหาค่าโพลีฟีนอลได้แก่ เนื้อแอปเปิ้ลและเปลือกแอปเปิ้ลที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี (รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง) ปิเปตต์สารตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับน้ำยา Folin-Ciocalteau ที่ถูกเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:10 จำนวน 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้ปิเปตต์ 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง โดยปราศจากแสงสว่าง และทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 740 นาโนเมตร

ในกรณีที่สารตัวอย่างที่นำมาทดสอบนั้น มีความเข้มข้นของโพลีฟีนอลสูงเกินกว่าค่ามาตรฐานที่เตรียมไว้ จะต้องนำไปทำการเจือจางก่อนที่จะนำมาทำการทดสอบ ซึ่งในการทดลองนี้จะต้องเตรียมการทดลอง 2 ชุด (duplicate) เพื่อความแน่นอนในการหาค่าโพลีฟีนอลที่ถูกต้อง ค่าของสารที่ต้องการทดลองที่ได้ จะถูกนำไปคำนวณเปรียบเทียบกับค่าของสารมาตรฐานแล้วคำนวณผ่านกราฟมาตรฐาน ถ้ามีการเจือจางสารที่นำมาทดลอง จะต้องมีการนำค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานไปคูณกับ dilution factor เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงด้วย โดยค่าโพลีฟีนอลที่ได้จะ

รายงานในหน่วยของ ppm gallic acid equivalents (ppm GAE) โดยความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิคที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ 10, 25, 50 และ 100 ppm

ซึ่งตัวอย่างในการเจือจางสารมาตรฐานกรดแกลลิค ณ ความเข้มข้นที่ต่างๆกัน และการเตรียมน้ำยา working Folin-Ciocalteau reagent กับ สารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนตนั้น ได้ถูกแสดงไว้ในภาคผนวกเพื่อความเข้าใจมากยิ่งขึ้น

3.6 การเตรียมสารสกัดให้เป็นสารละลายที่ความเข้มข้นตั้งต้น

เมื่อได้สารสกัดแอปเปิ้ลจากวิธีการสกัดอย่างหยาบที่ผ่านการวัดค่าโพลีฟีนอลจากวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่างแล้ว ให้นำสารสกัดนั้นมาทำเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นตั้งต้น (Stock solution) เพื่อที่จะนำไปใช้ทดสอบในการทดลองขั้นต่อไปด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยนำส่วนของสารสกัดที่ได้จากส่วนของเนื้อและเปลือกแอปเปิ้ล มาเตรียมเป็นสารละลายตั้งต้นที่มีความเข้มข้นในหน่วยของ กรัม/มิลลิลิตร (น้ำหนักของสารสกัดจากแอปเปิ้ลในหน่วยกรัม ละลายในตัวทำละลาย DMSO จำนวน 1 มิลลิลิตร) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารสกัดที่นำมาเตรียมอีกด้วย

ในขั้นตอนของการเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นตั้งต้นนี้ ไม่ควรใช้ความร้อนในการช่วยการละลายของ DMSO เพราะจะทำให้สารที่นำมาเตรียมนั้นเกิดการไหม้ได้ ในกรณีนี้ต้องกลับไปปรับที่ความเข้มข้นให้ลดลงกว่าเดิมแทน

3.7 การกรอง sterile

เป็นขั้นตอนที่จะทำให้สารสกัดปราศจากเชื้อ เพื่อที่จะสามารถนำมาใช้ทดลองกับเซลล์มะเร็งได้ โดยนำสารสกัดที่ผ่านการเตรียมเป็นสารสะลายที่ความเข้มข้นตั้งต้นแล้วมาทำการกรองผ่านหัวกรองที่ปราศจากเชื้อ (sterile filter) ที่มีขนาดรูเท่ากับ 0.4 ไมโครเมตร โดยในขั้นตอนของการกรองนั้นต้องใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ (sterile technique) ด้วย เมื่อผ่านขั้นตอนการกรองเสร็จแล้ว ให้ทดสอบยืนยันอีกครั้งว่าสารสกัดที่ได้ปลอดเชื้อจริง โดยนำสารสกัดไปทำการเพาะเชื้อด้วย blood agar จากนั้นนำสารที่ได้ไปเก็บไว้ ณ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในหลอดทดลองปลอดเชื้อที่หุ้มกระดาษฟอยล์ เพราะสารโพลีฟีนอลเป็นสารที่ไวต่อแสง

ในกรณีที่สารสกัดไม่สามารถกรองผ่านหัวกรองได้ แสดงว่าความเข้มข้นที่ใช้เตรียมนั้นมากเกินไป ต้องกลับไปปรับให้มีความเข้มข้นลดลงในขั้นตอนของการเตรียมสารสกัดให้เป็นสารละลายที่ความเข้มข้นตั้งต้นนั่นเอง

3.8 เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลอง

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 6 cell lines ด้วยกัน อันได้แก่

- SW480 เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colon adenocarcinoma)
  ได้รับมาจาก ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร
  ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์
  จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- HeLa เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical cancer cell)
  ได้รับมาจาก รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล
  ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์
  จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- HT-29 เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colon adenocarcinoma)
  ได้รับมาจาก ผศ.ดร.วีระ วงศ์คำ
  ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
  มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- HepG2 เป็นเซลล์มะเร็งตับ (Human liver hepatoblastoma)
  ได้รับมาจาก รศ.พญ.ดร.ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์
  ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์
  จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- HEp2 เป็นเซลล์มะเร็งกล่องเสียง (Human larynx carcinoma)
  ได้รับมาจาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวากุล
  ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์
  จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- HaCaT เป็นเซลล์หนังกำพร้าที่สร้าง keratin (Human keratinocyte) ได้รับมาจาก ผศ.พญ.ดร.จงกลนี วงศ์ปิยะบวร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เหล่านี้คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มีส่วนประกอบของ 10% Fetal Bovine Serum (FBS), Antibiotics, Antimycotics โดยเซลล์มะเร็งจะทำการเพาะเลี้ยงภายในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80%

3.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

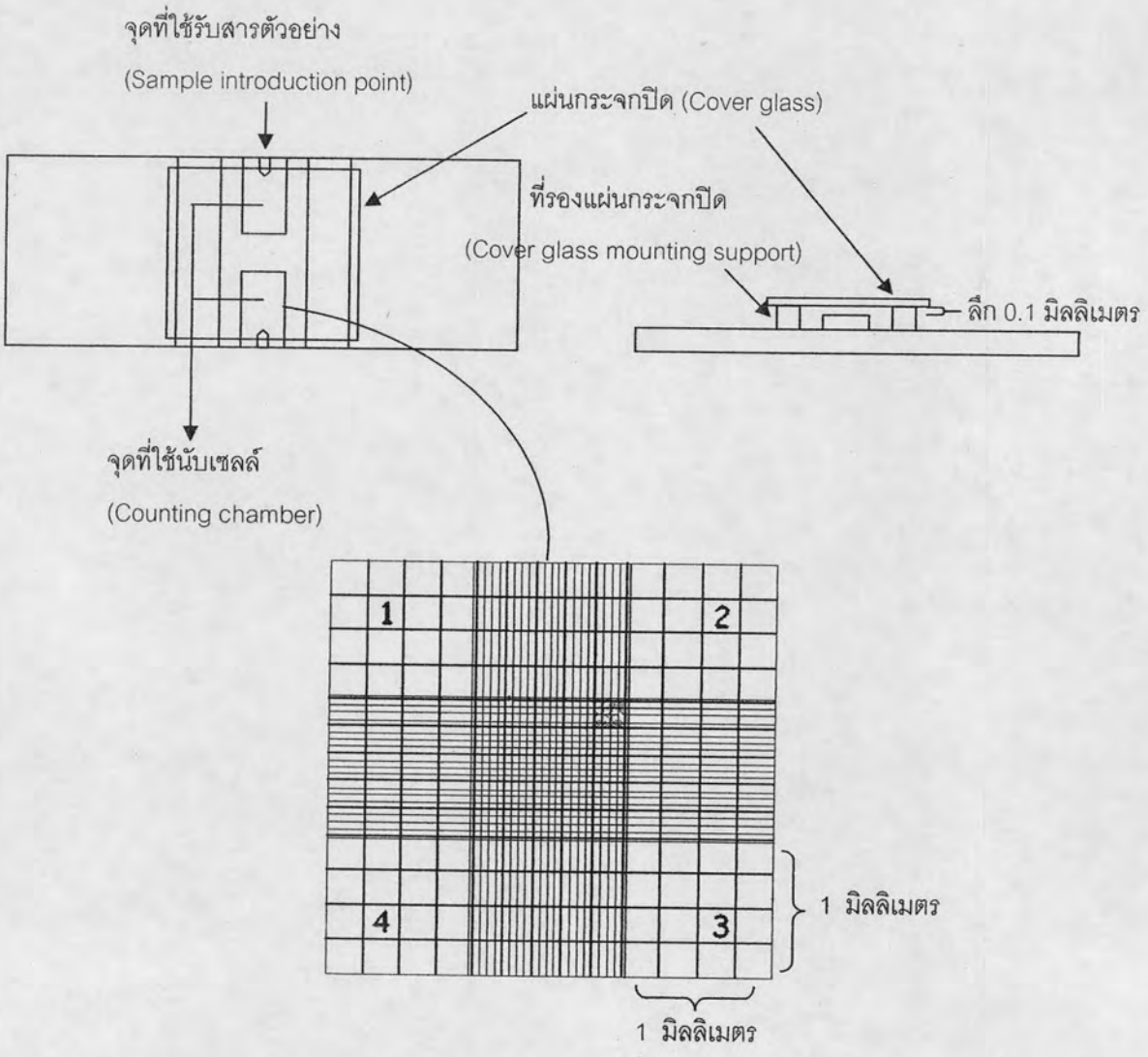
3.9.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ล้างเซลล์มะเร็งที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร (T25) ด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่ไม่มีส่วนผสมของแมกนีเซียม (Mg^{2+}) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร ถ้าทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 มิลลิลิตร (T75) จะใช้ PBS จำนวน 10 มิลลิลิตร จากนั้นให้เท PBS ออก ก่อนที่จะปิเปตต์ 0.25% ทริปซิน (1X Trypsin) ลงไปจำนวน 1 มิลลิลิตรต่อเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T25 และ 3 มิลลิลิตร ต่อเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงใน ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T75 ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เททริปซินออกให้มากที่สุด ก่อนที่จะนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ไปบ่มในตู้บ่ม 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 5 นาที ทั้งนี้เพื่อให้เซลล์มะเร็งที่เกาะอยู่ที่ผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นหลุดง่ายยิ่งขึ้น ปิเปตต์ DMEM ลงไปฉีดล้างเซลล์มะเร็งที่เกาะอยู่ข้างผิวขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นให้ดูดสารละลายเซลล์ทั้งหมดใส่ลงหลอดปั่นเหวี่ยง เพื่อนำเซลล์ไปปั่นล้างเอาทริปซินออกเป็นเวลา 5 นาที 1500 rpm ที่ 25 องศาเซลเซียส ในขั้นนี้เซลล์จะถูกทำให้เกาะตัวแน่นอยู่ที่ก้นหลอดปั่นเหวี่ยง เท DMEM ออกให้หมด ก่อนที่จะเขย่าเซลล์ให้หลุดออกจากกัน จากนั้นใส่ DMEM ลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ ปิเปตต์สารละลายเซลล์นี้ออกมา 10 ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน สี trypan blue จำนวน 90 ไมโครลิตร แล้วนำไปนับด้วย Hemocytometer counting chamber

เมื่อทราบจำนวนเซลล์ทั้งหมดแล้ว จะสามารถนำไปเข้าสู่การคำนวณเทียบบัญญัติไตรยางค์เพื่อหาจำนวนที่ต้องปิเปตต์สารละลายเซลล์ เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ตามที่ต้องการได้ ปิเปตต์สารละลายเซลล์จำนวนที่ต้องการใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขวดใหม่ ก่อนที่จะเติม DMEM ลงไปให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ต่อขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T25 และ 15 มิลลิลิตรต่อขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T75 จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง เข้าตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้น 80% เพื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

3.9.2 การคำนวณจำนวนเซลล์มะเร็ง

ในการนับเซลล์มะเร็งนี้จะใช้เครื่องมือที่มีชื่อว่า Hemocytometer counting chamber โดยวางแผ่นกระจกสไลด์ลงบนที่รองแผ่นกระจกปิด (Cover glass mounting support) จากนั้นให้เจือจางสารละลายเซลล์ด้วยสี trypan blue ตามอัตราส่วน 1:10 (dilution factor =10) ซึ่งในกรณีของเซลล์มะเร็งที่ตายแล้ว สี trypan blue จะสามารถผ่านเข้าไปทางเมมเบรนและทำให้เซลล์ที่ตายเกิดการติดสีได้ เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตต์สารละลายเซลล์ที่ทำการเจือจางแล้วใส่ใน Hemocytometer counting chamber จำนวน 10 ไมโครลิตร โดยให้ปลายปิเปตต์แตะที่ขอบของ hemocytometer counting chamber ตรงตำแหน่งจุดที่ใช้รับสารตัวอย่าง (Sample introduction point) ทิ้งไว้สักครู่ เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 4 พื้นที่ ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ตามภาพที่ 12 ทั้ง 2 ข้างของ counting chamber เพื่อนำมาใช้ในการหาค่าเฉลี่ย ซึ่งเซลล์ที่นับนั้นจะต้องเป็นเซลล์เป็น โดยสังเกตจากสีของเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่ตายแล้วจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue นั่นเอง



ภาพที่ 12 : **ภาพ** hemocytometer counting chamber

จากนั้นนำจำนวนเซลล์ตามที่นับได้ทั้งหมด มาเข้าสูตรคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรโดยรวมทั้งหมดดังต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ x dilution factor}}{\text{จำนวนพื้นที่ที่ใช้นับ (ช่อง) x ปริมาตรของchamber}}$$

โดยในที่นี้ ปริมาตรของ chamber = 1 x 1 x 0.1 = 10^{-4} ลูกบาศก์เซนติเมตร

Dilution factor = 10

จำนวนพื้นที่ที่ใช้นับ 2 ข้าง ข้างละ 4 ช่อง = 8 ช่อง

ทั้งนี้ในการนับจำนวนเซลล์แต่ละครั้ง ควรจะมีจำนวนเซลล์ที่ติดสีของ trypan blue หรือจำนวนเซลล์ตายไม่เกิน 20% ของจำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด

3.9.3 **การแช่แข็งเซลล์มะเร็ง** (Freeze cell)

การแช่แข็งเซลล์มะเร็ง เป็นการเก็บรักษาเซลล์มะเร็งไว้ เพื่อใช้ในงานต่อไป จำเป็นที่ต้องทำเป็นระยะๆตลอดการทดลอง เผื่อในกรณีที่เซลล์มะเร็งตาย หรือเกิดการปนเปื้อน จะได้มีเซลล์มะเร็งไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

ในขั้นตอนแรกของการแช่แข็งเซลล์มะเร็งเพื่อเก็บรักษานั้น จะเหมือนกับวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของการล้างเซลล์ด้วย PBS การทำให้เซลล์มะเร็งหลุดจากที่ยึดเกาะด้วยทริปซินหรือแม้กระทั่งการนับเซลล์ จากนั้นเมื่อทราบจำนวนเซลล์มะเร็งทั้งหมดแล้ว ให้นำมาคำนวณหาปริมาตรที่จะต้องปิเปตต์มาเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ต้องการ ซึ่งโดยปกติแล้วจำนวนเซลล์ที่นิยมใช้ในการแช่แข็งคือ 2 x 10^6 ถึง 5 x 10^6 เซลล์ ต่อปริมาตรโดยรวม 1 มิลลิลิตร

เมื่อปิเปตต์สารละลายเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแล้ว ให้นำไปปั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อปั่นแยกเอา DMEM ออกมา เท DMEM ออกมาให้มากที่สุด ก่อนที่จะปิเปตต์ FBS ที่แช่เย็นลงไปจำนวน 900 ไมโครลิตร เขย่าเซลล์ให้เข้ากัน จากนั้นค่อยๆทำการปิเปตต์ DMSO ลงไป 100 ไมโครลิตร โดยในการปิเปตต์ DMSO นั้น ให้ค่อยๆปล่อยสารละลายลงไป และคอยเขย่าให้เข้ากันเป็นระยะ เพื่อไม่ให้ DMSO เป็นพิษกับเซลล์มากเกินไป โดยปริมาตรสุดท้ายจะเท่ากับ 1 มิลลิลิตรนั่นเอง

ปิเปตต์สารละลายเซลล์ทั้งหมดลงใน Cryovial tube แช่เย็นที่เตรียมไว้ โดยหลักการแช่แข็งเซลล์นั้นจะต้องค่อยๆให้ความเย็นแก่เซลล์ขึ้นเรื่อยๆ ก่อนที่จะนำเซลล์ไปแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวในขั้นตอนสุดท้าย โดยจะต้องนำเซลล์ไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปให้ความเย็นต่อที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ให้นำเซลล์ไปให้ความเย็นที่ -80 องศาเซลเซียส ต่ออีก 1 วัน ก่อนที่จะนำเซลล์ไปทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวในที่สุด

ส่วนในเรื่องของการเก็บรักษาเซลล์ใน DMSO ทั้งๆที่ DMSO เป็นพิษต่อเซลล์ ก็เพราะว่า เวลาแข็งตัว น้ำจะเกิดการขยายตัว ทำให้เซลล์แตกได้ แต่ DMSO จะไม่เกิดการขยายตัว จึงมีความปลอดภัยต่อเซลล์นั่นเอง

3.9.4 **การละลายเซลล์มะเร็ง** (Thaw cell)

เป็นการนำเซลล์ที่ถูกแช่แข็งอยู่ละลายออกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไป โดยเริ่มแรกให้นำเซลล์ที่เพิ่งเอาออกมาจากไนโตรเจนเหลวมาทำให้ละลายอย่างรวดเร็ว ด้วยการแกว่ง Cryovial tube ใน Waterbath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นให้รีบปิเปตต์สารละลายเซลล์ใน Cryovial tube ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มี DMEM อยู่ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อปั่นเอา DMSO ออก เสร็จแล้วเซลล์จะตกตะกอนเกาะตัวแน่นที่ก้นหลอดปั่นเหวี่ยง เทน้ำส่วนบนออก จากนั้นใส่ DMEM ลงไป จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ก่อนที่จะทำการปิเปตต์สารละลายเซลล์ที่ได้ ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 เพื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

3.10 **การคัดเลือกเซลล์มะเร็ง**

เซลล์มะเร็งที่จะนำมาใช้ในการวิจัย จะต้องเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน RAGE อยู่บนผิวเซลล์ โดยขั้นตอนการคัดเลือกชนิดของเซลล์มะเร็งนั้น จะวัดจากปริมาณ mRNA เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน RAGE บนผิวเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด ซึ่งจะต้องนำเซลล์มะเร็งมาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้น้ำยา TRIZOL®Reagent (Invitrogen)

จากนั้น นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปเข้าสู่กระบวนการ treat ด้วยน้ำยา Deoxyribonuclease I (DNase I) จากบริษัท Invitrogen โดยเป็นขั้นตอนที่ใช้ทำลายดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนมาในขั้นตอนของการสกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อไม่ให้มีดีเอ็นเอเข้ามาปนเปื้อนในการทดลองขั้นต่อไป และทำการวัดการแสดงออกของ RAGE โดยใช้ RT-PCR ซึ่ง primer ที่นำมาใช้นั้นเป็น primer ของ G82S ซึ่งเป็นความหลากหลายของยีน RAGE (polymorphism) ตำแหน่งหนึ่ง ที่สามารถพบได้บน exon ที่ 3 ของยีน RAGE ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งนั้น จะต้องทำการทดลองควบคู่ไปกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจะใช้ primers ของยีน GAPDH ซึ่งเป็น House-keeping Gene เป็นตัวเปรียบเทียบเสมอ

ในขั้นตอนของ RT-PCR นี้ จะใช้ชุดน้ำยา SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase ของบริษัท Invitrogen ซึ่งเป็นชุดน้ำยาที่สามารถทำขั้นตอนของ cDNA synthesis และ PCR amplification ได้ในหลอดทดลองเดียวกัน โดยสามารถแจกแจงรายละเอียดได้ดังต่อไปนี้ ปิเปตต์อาร์เอ็นเอจำนวน 0.5 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นให้ ปิเปตต์น้ำยาดังต่อไปนี้ ได้แก่

- 2X Reaction Mix จำนวน 12.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา
- Forward-primer และ Reverse-primer เส้นละ 0.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา ทั้งในยีน RAGE และยีน GAPDH
- SuperScript™ III RT/Platinum® *Taq* Mix จำนวน 1 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 25 ไมโครลิตร โดยในแต่ละหลอดทดลองนั้น ต้องมีการทำ negative control เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมยืนยันว่าผลผลิต PCR ที่ได้ ไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยข้อแตกต่างระหว่าง negative control เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง คือ ในกลุ่มของ negative control จะใช้ *Taq* ธรรมดา ที่ไม่มีความสามารถในเรื่องของการเป็น reverse transcriptase เหมือนกับ SuperScript™ III RT/Platinum® *Taq* ดังนั้น อาร์เอ็นเอในหลอดของกลุ่ม negative control นั้น จะไม่ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของดีเอ็นเอ นั่นเอง

ลำดับเบสและขนาดของผลผลิต PCR ของ G82S และ GAPDH primers นั้น ได้แสดงตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 ลำดับเบสและขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก primer แต่ละตัวในขั้นตอนของการคัดเลือกเซลล์มะเร็ง

ยีน	primer	Sequence	ขนาดผลผลิต (bp)
G82S	reverse	5'-GGCCAAGGCTGGGGTTGAAGG-3'	397
	forward	5'-GTAAGCGGGGCTCCTGTTGCA-3'	
GAPDH	reverse	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	266
	forward	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	

ซึ่งโปรแกรมของเครื่อง thermal cycler ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของผลผลิตดีเอ็นเอนั้นสามารถแจกแจงเป็นตารางได้ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 : แสดงอุณหภูมิ, ระยะเวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนการทำ RT-PCR

ขั้นตอน	องศาเซลเซียส		ระยะเวลา	จำนวนรอบ
	G82S	GAPDH		
cDNA synthesis	60	60	30 นาที	1
Pre-heat	94	94	2นาที	1
Denature	94	94	30 วินาที	30
Annealing	65	58	30 วินาที	
Extension	68	68	1 นาที	
Final extension	68	68	10 นาที	1
Hold temp	4	4	∞	-

3.11 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Cell proliferation assay)

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่ต้องการทดสอบลงใน 96-Well Plate ลงในแต่ละหลุมด้วย 10% FBS working DMEM ซึ่งในแต่ละหลุมนั้น จะต้องใช้จำนวนเซลล์ปริมาณ 5×10^3 เซลล์ ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เพื่อให้เซลล์มะเร็งเกาะพื้น เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เตรียมสารสกัดแอปเปิ้ลที่ต้องการทดสอบ ณ ความเข้มข้นต่างๆ โดย 10% FBS working DMEM จะถูกนำมาใช้ในการเจือจางสารสกัดจากแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบต่างๆทั้ง 3 วิธี รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่างด้วยกัน เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นที่ต้องการ

ในการคำนวณความเข้มข้นนั้นจะใช้สูตรดังต่อไปนี้ โดยขออนุญาตยกตัวอย่างในการเตรียมสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 เพื่อให้มีความเข้าใจได้ง่ายขึ้น

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นตั้งต้นของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ซึ่งในที่นี้คือ 4 กรัม/มิลลิลิตร (4×10^6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

V_1 = ปริมาตรของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ล ด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 จากความเข้มข้นตั้งต้น ที่ต้องปิเปตต์มาในหน่วยของ ไมโครลิตร

C_2 = ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่ต้องการเตรียมเพื่อทำการบ่มกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะอยู่ในหน่วยของ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรสุดท้ายของระบบที่ใช้ในการทดลองเรื่อง การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยในที่นี้คือ 200 ไมโครลิตร

จากนั้นปิเปตต์สารสกัดที่เตรียมไว้ลงไป 100 ไมโครลิตร/หลุม ซึ่งจะมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม

เนื่องจาก DMSO เป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ ดังนั้นเพื่อเป็นการทวนสอบว่าปริมาณ DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดจากแอปเปิ้ลนั้น ไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบแต่อย่างใด จึงต้องมีกลุ่มควบคุมขึ้นมาอีก 1 กลุ่มที่นอกเหนือจากกลุ่มควบคุมปกติ (ใส่ DMEM 100 ไมโครลิตร แทนสารสกัดแอปเปิ้ล) ซึ่งกลุ่มควบคุม DMSO นี้ จะถูกเตรียมให้มีความเข้มข้น DMSO อยู่ 1% ซึ่งในความเข้มข้นระดับนี้จะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบแต่อย่างใด นอกจากนี้ปริมาณของ DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดที่นำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งนั้น ก็จะถูกควบคุมไม่ให้เกินระดับของ 1% DMSO อีกด้วย

สำหรับการคำนวณเรื่อง % DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่นำมาใช้ในการทดสอบนั้น สามารถคำนวณได้ดังต่อไปนี้

ระดับของ DMSO ในสารสกัด จะต้องมีค่าไม่เกิน		1	%
หมายความว่าในสารละลาย 100 ส่วน จะต้องมี DMSO อยู่ไม่เกิน 1 ส่วน			
ซึ่งปริมาตรสุดท้ายของระบบที่ใช้ในการทดลองคือ		200	ไมโครลิตร
ดังนั้น จะต้องมี DMSO ในสารสกัดไม่เกิน	=	1/100 x 200	
	=	2	ไมโครลิตร

เนื่องจากสารสกัดแอปเปิ้ลที่สกัดได้นั้น จะถูกนำมาละลายใน DMSO หมายความว่า ถ้าปิเปตต์สารสกัดแอปเปิ้ลมา 2 ไมโครลิตร จะมี DMSO อยู่ 2 ไมโครลิตรเช่นกัน ดังนั้นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเตรียมได้ในกรณีของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 คือ

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

C_1 = ความเข้มข้นตั้งต้นของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ซึ่งในที่นี้คือ 4 กรัม/มิลลิลิตร (4×10^6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

V_1 = ปริมาตรของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ล ด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 จากความเข้มข้นตั้งต้น ที่สามารถปิเปตต์ได้สูงสุด ในที่นี้เท่ากับ 2 ไมโครลิตร

C_2 = ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่ต้องการเตรียมเพื่อทำการบ่มกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะอยู่ในหน่วยของ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรสุดท้ายของระบบที่ใช้ในการทดลองเรื่อง การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยในที่นี้คือ 200 ไมโครลิตร

ดังนั้น $(4 \times 10^6)(2) = C_2(200)$

$C_2 = 4 \times 10^4$

แสดงว่าความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ จะต้องมีความเข้มข้นไม่เกิน 4×10^4 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร แต่ในการเตรียมสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่จะนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งนั้น จะต้องมีขั้นตอนในการเตรียมสารสกัดจำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเสียก่อน ซึ่งในแต่ละหลุมการทดลองนั้น จะมีสารละลายเซลล์มะเร็งอยู่แล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมการทดลอง ก็คือ 200 ไมโครลิตรนั่นเอง ดังนั้นสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่ได้เตรียมไว้ จะถูกเจือจางลงเป็นครึ่งหนึ่งเช่นกัน ดังแสดงตามสมการดังต่อไปนี้

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

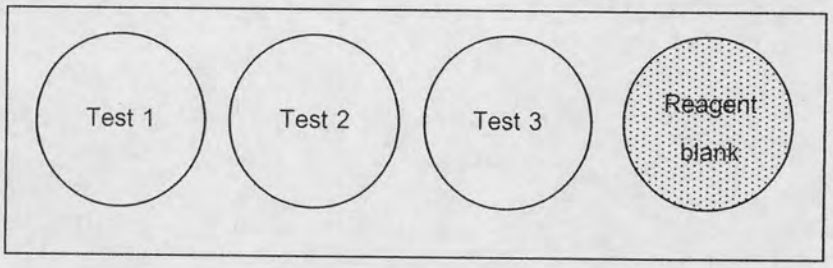
$(4 \times 10^6)(100) = C_2(200)$

$C_2 = 2 \times 10^4$

ดังนั้น ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถบ่มกับเซลล์มะเร็งได้จริง จะมีค่าความเข้มข้นสุดท้ายได้ไม่เกิน 2×10^4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรนั่นเอง

บ่มเซลล์มะเร็งกับสารสกัดจากแอปเปิ้ลเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติมน้ำยา MTS (CellTiter 96 R AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) ลงในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ 96-Well plate มาปั่นที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน จากนั้นปิเปตต์น้ำใสส่วนบน นำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง ELISA reader

ในการทำการทดลองแต่ละครั้งในแต่ละความเข้มข้น จะต้องเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้งหมด 3 หลุมต่อ 1 ความเข้มข้น (triplicate) นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อความแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ในการอ่านค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเข้มข้นนั้น เนื่องจากสารสกัดที่นำมาใช้บ่มกับเซลล์มะเร็งนั้น เป็นสารที่มีสี จึงก่อให้เกิดการรบกวนการวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ดังนั้นจึงต้องมีการหักลบการรบกวนนี้ออก ดังแสดงตามภาพที่ 13



ภาพที่ 13 : ตัวอย่างแผนผังการบ่มเซลล์ในแต่ละชุดความเข้มข้น

- test 1-3 = เซลล์ + DMEM + สารสกัด + น้ำยา MTS
- reagent blank = DMEM + สารสกัด + น้ำยา MTS

$$\text{ค่าการดูดกลืนแสง} = \frac{(Abs_{test1}-Abs_{reagent\ blank})+(Abs_{test2}-Abs_{reagent\ blank})+(Abs_{test3}-Abs_{reagent\ blank})}{3}$$

Abs (Absorbance) = ค่าการดูดกลืนแสง

Reagent blank = ค่าที่ใช้ในการหักลบค่ารบกวนการทดลอง

โดยค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละชุดความเข้มข้นนั้น จะถูกนำมาคำนวณเพื่อหา % ของ Cell Viability ตามสูตรดังต่อไปนี้

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

นอกจากนี้ ในเรื่องของการหาค่า IC_{50} นั้น จะเริ่มจากการบ่มเซลล์มะเร็งกับสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่ได้เตรียมไว้ในช่วงของค่าความเข้มข้นเป็นช่วงกว้างเสียก่อน ที่จะทำการเจาะค่าความเข้มข้นให้เป็นช่วงแคบมากขึ้น เพื่อทำการหาค่า IC_{50} ยกตัวอย่างเช่น ในสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลที่ได้จากวิธีการสกัดแบบที่ 3 สำหรับเซลล์มะเร็ง SW480 และ เซลล์มะเร็ง HeLa นั้น จะทดลองที่ความเข้มข้นในช่วง 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเสียก่อน เมื่อได้ช่วงของค่าความเข้มข้นของ IC_{50} ในแต่ละเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดแล้ว จึงค่อยทำการเจาะความเข้มข้นให้เป็นช่วงที่แคบ และมีความละเอียดมากยิ่งขึ้น คือ 0, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรนั่นเอง

เมื่อได้ช่วงที่เกิดค่า IC_{50} แล้ว ให้ทำการยืนยันผลการทดลองที่ได้ โดยทำซ้ำการทดลองเดิมอีก 3 ครั้ง ก่อนที่จะทำการสรุปผล ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นนั้นพบว่า สารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 นั้นมีความเหมาะสมในการทดลองมากที่สุด

3.12 การทดสอบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง (Cell invasion assay)

ในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งนี้ ผู้ทำการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ นพ. ดร. กวิญ ลีละวัฒน์ โรงพยาบาลราชวิถี ในเรื่องของการให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางเกี่ยวกับรายละเอียดของวิธีการทำการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง หรือที่เรียกว่า Invasion assay ทั้งนี้ผู้ทำการทดลองได้นำความรู้ที่ได้รับ มาปรับปรุงและประยุกต์ให้เข้ากับการทดลอง เพื่อให้ได้วิธีที่มีความเหมาะสมกับการทดลอง ดังที่จะกล่าวต่อไปนี้

3.12.1 ความเข้มข้นของสารสกัดแอปเปิ้ล

ความเข้มข้นของสารสกัดที่จะนำมาใช้ในการทดสอบกับเซลล์มะเร็งนั้น จะต้องเป็นความเข้มข้นที่ไม่เกินค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดลองในเรื่องของการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ด้วยเหตุที่ว่า ถ้าใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินกว่าค่า IC_{50} นั้น เซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบอาจตายได้ เนื่องจากสารสกัดก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์มะเร็งหรือที่เรียกว่า เกิด toxicity ขึ้นต่อเซลล์มะเร็งนั่นเอง

3.12.2 กลุ่มควบคุม

เนื่องจากสารสกัดที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ถูกละลายด้วยตัวทำละลายที่มีชื่อว่า DMSO ซึ่งถ้าใช้ในปริมาณมากอาจก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ใช้ในการทดลองขึ้นได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่า การที่เซลล์มะเร็งนั้นมีความสามารถในเรื่องของการรุกรานลดลงนั้น ไม่ได้เกิดจากผลกระทบของ DMSO แต่อย่างใด จึงต้องมีการกำหนดกลุ่มควบคุมที่นอกเหนือจากกลุ่มควบคุมปกติ (กลุ่มของเซลล์มะเร็งที่บ่มกับ DMEM แต่เพียงอย่างเดียว) ซึ่งก็คือกลุ่มของเซลล์มะเร็งที่บ่มกับ DMSO ในความเข้มข้น 0.1% ขึ้นมาอีก 1 กลุ่มนั่นเอง

ส่วนสาเหตุที่ใช้ 0.1% DMSO ในกลุ่มควบคุมของเซลล์มะเร็งที่บ่มกับ DMSO ในการทดลองเรื่องของการรุกรานของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็ง SW480 และเซลล์มะเร็ง HeLa นี้ เนื่องมาจาก ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่นำมาใช้บ่มกับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 นี้มี % DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดจากแอปเปิ้ล อยู่ในระดับที่ไม่เกิน 0.1% DMSO นั่นเอง

โดยการคำนวณนั้น เริ่มจากในเรื่องการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจากสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่ทำการบ่มกับเซลล์มะเร็งมากที่สุดในระดับของ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อปริมาตรโดยรวม 500 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

C_1 = ความเข้มข้นตั้งต้นของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ซึ่งในที่นี้คือ 4 กรัม/มิลลิลิตร (4×10^6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

V_1 = ปริมาตรของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ล ด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 จากความเข้มข้นตั้งต้นที่สามารถปิเปตต์ได้สูงสุด ในที่นี้คือ ปริมาตรที่ต้องการหา ในหน่วยของไมโครลิตร

C_2 = ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 ที่ต้องการเตรียมเพื่อทำการบ่มกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะอยู่ในหน่วยของ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยในที่นี้มีค่าเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรสุดท้ายของระบบที่ใช้ในการทดลองเรื่อง การวัดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง โดยในที่นี้คือ 500 ไมโครลิตร

ดังนั้น $(4 \times 10^6) V_1 = (1000)(500)$

$V_1 = 0.125$

แสดงว่า ปริมาตรที่ต้องปิเปตต์มาจากสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบที่ 3 จากความเข้มข้นตั้งต้นนั้น เท่ากับ 0.125 ไมโครลิตร แต่สารสกัดจากแอปเปิ้ลที่สกัดมาได้นั้น ถูกนำทำละลายด้วยสารละลาย DMSO ดังนั้นถ้าปิเปตต์สารสกัดตั้งต้นมา 0.125 ไมโครลิตร ก็จะมีส่วนผสมของ DMSO อยู่ 0.125 ไมโครลิตรด้วยนั่นเอง เมื่อนำปริมาตรสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลที่ปิเปตต์ มาคิดเป็น % DMSO ที่อยู่ในระบบของการทดลอง ด้วยการเทียบบัญญัติไตรยางค์แล้ว จะได้ค่าดังต่อไปนี้

ในปริมาตรโดยรวมของการทดลอง 500 ไมโครลิตร จะมี DMSO อยู่ 0.125 ไมโครลิตร
ดังนั้นถ้า ปริมาตรโดยรวมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร จะมี DMSO อยู่ $0.125/500 \times 100$
$= 0.025$ %

จะเห็นได้ว่า % DMSO ที่นำมาใช้ในการละลายสารสกัดจากเปลือกแอปเปิ้ลนั้นอยู่ในระดับที่ไม่เกิน 0.1% DMSO นั่นเอง

3.12.3 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการรุกราน ของเซลล์มะเร็ง

ในเรื่องการทดลองการรุกรานของเซลล์มะเร็งนั้น ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องที่ก่อให้เกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ % Matrigel ที่นำมาใช้ในการเคลือบ insert ระยะเวลาในการบ่มเซลล์มะเร็ง เป็นต้น ซึ่งเป็นที่แน่นอนว่าปัจจัยเหล่านี้ ก็จะแตกต่างกันไปในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด ดังนั้น จึงต้องมีการทดลอง condition เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

3.12.3.1 เซลล์มะเร็ง SW480

สำหรับเซลล์มะเร็ง SW480 นั้น ในขั้นแรกผู้ทำการทดลองได้ทดลองใช้ 0.5, 0.2 และ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Matrigel เคลือบลงบน insert แล้วปล่อยให้เซลล์มะเร็ง SW480 ทำการรุกรานเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ให้นำ insert ไปทำการ fix และส่องด้วยกล้อง light microscope ว่าเซลล์มะเร็ง SW480 ในกลุ่มควบคุมนั้น สามารถเกิดการรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert ในสภาวะใดได้ดีที่สุด โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่เซลล์มะเร็ง SW480 สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert ได้นั้น จะอยู่ที่เวลา 72 ชั่วโมง ณ ความเข้มข้น Matrigel ที่เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

3.12.3.2 เซลล์มะเร็ง HeLa

เนื่องจากในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งนี้ ผู้ทำการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ นพ. ดร. กวิญ ลีละวัฒน์ โรงพยาบาลราชวิถี ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของการชี้แนะแนวทางเกี่ยวกับรายละเอียดของวิธีการทำ invasion assay อีกทั้งยังได้รับคำแนะนำถึงสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็ง HeLa อีกด้วย โดยสภาวะที่เหมาะสมที่เซลล์มะเร็ง HeLa สามารถรุกรานลงมายังด้านล่างของ insert ได้นั้น จะอยู่ที่เวลา 24 ชั่วโมง ณ ความเข้มข้น Matrigel ที่เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

3.12.4 วิธีทำ

ในการทดลองเรื่องการรุกรานของเซลล์มะเร็งนั้น จะใช้หลักการของ Matrigel invasion assay เพื่อดูความสามารถในการรุกรานของเซลล์มะเร็งผ่าน Matrigel ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร สำหรับเซลล์มะเร็ง HeLa และ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร สำหรับเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลือบอยู่บนเมมเบรมที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 8 ไมโครเมตร ของ insert ใน 24 well Companion plate ซึ่งอุปกรณ์ทั้ง 2 อย่างนี้เป็นชุดการทดลองเรื่อง Invasion assay จากบริษัท Becton-Dickinson ทั้งสิ้น ส่วยข้อดีของ 24 well Companion plate ที่ต่างจาก 24-well plate ทั่วไปคือ 24 well Companion plate ของบริษัท Becton-Dickinson นั้นจะมีตัว lock ทำให้ insert ไม่ขยับเขยื้อโดยง่าย และขนาดความลึกของแต่ละหลุมใน 24 well Companion plate จะมีขนาดที่เหมาะสมกับ insert ของบริษัท Becton-Dickinson โดยเฉพาะ ทำให้ก้นของ insert จะไม่ชนเข้ากับก้น plate นั่นเอง โดยขั้นตอนการทดลองนั้นจะถูกแบ่งออกเป็น 3 วันสำหรับเซลล์มะเร็ง HeLa และ 5 วันสำหรับเซลล์มะเร็ง SW480

โดยในวันแรกของการทดลอง จะต้องนำเซลล์มะเร็งที่จะใช้ในการทดลองมาทำให้อดอยาก (Starvation) ด้วย 1% FBS working DMEM เป็นเวลาข้ามคืน โดยใช้จานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาด 100 mm x 20 mm ในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเตรียมเซลล์ที่จะใช้ในการทดลองในวันพรุ่งนี้เสร็จเรียบร้อยแล้ว จากนั้นจะต้องเตรียม การเคลือบเมมเบรนด้วย Matrigel โดยนำ Matrigel ที่เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ออกมาทำให้ละลายด้วยการวางบนน้ำแข็ง (thaw on ice) ซึ่งความเข้มข้นของ Matrigel ที่จะใช้ต่อ insert นั้นจะเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรสำหรับเซลล์มะเร็ง SW480 และ 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรสำหรับเซลล์มะเร็ง HeLa แต่ Matrigel ที่ทำการซื้อจากบริษัท Becton-Dickinson จะมีความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 9.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ดังนั้นจึงต้องนำมาทำการเจือจางด้วย DMEM (Serum free medium) โดยคำนวณตามสูตรดังต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นของ Matrigel ตั้งต้น ซึ่งในที่นี้คือ 9.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)

V_1 = ปริมาตรของ Matrigel ที่ต้องปิเปตต์มาจาก Matrigel ตั้งต้น ซึ่งในที่นี้คือส่วนที่ต้องการหาจากสมการนั่นเอง (ไมโครลิตร)

C_2 = ความเข้มข้นของ Matrigel ที่ต้องการเตรียม ซึ่งในที่นี้คือ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรสำหรับเซลล์มะเร็ง SW480 และ 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร สำหรับ เซลล์มะเร็ง HeLa (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)

V_2 = ปริมาตรทั้งหมดที่ต้องการเตรียมของ Matrigel ณ ความเข้มข้นที่ต้องการ (ไมโครลิตร)

ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเพื่อทำการผสมให้เข้ากัน โดยต้องระวังเพื่อไม่ทำให้เกิดฟองอากาศขึ้น เมื่อได้ Matrigel ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว วาง insert ลงบนหลุมใน 24 well Companion plate จากนั้นค่อยๆปิเปตต์ Matrigel ที่ทำการเจือจางด้วย DMEM (Serum free medium) จำนวน 100 ไมโครลิตร/หลุม/insert โดยไม่ทำให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลาข้ามคืน

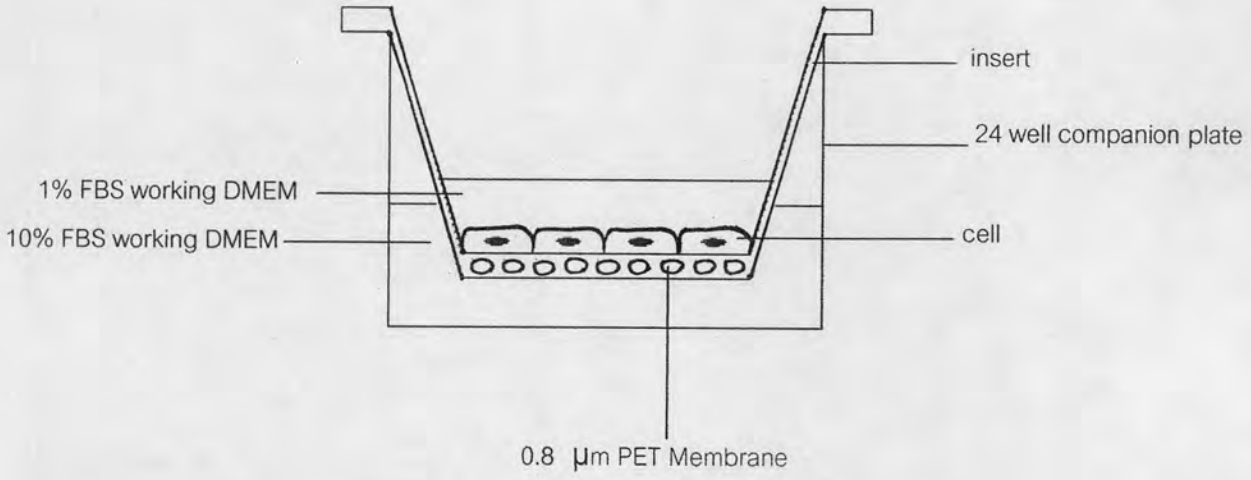
สำหรับการทดลองในวันที่ 2 เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว นำ insert ที่ถูกเคลือบด้วย Matrigel ออกมาจากตู้บ่ม ก่อนที่จะปิเปตต์ DMEM ที่มีส่วนผสมของ 1% FBS working DMEM ลงไปในแต่ละ insert จำนวน 500 ไมโครลิตร ทั้งนี้เพื่อไม่ให้เจลที่เคลือบไว้บน insert แห้ง และทำให้เกิด polymerize ดีมากยิ่งขึ้น จากนั้นจึงนำเข้าไปบ่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ในขณะที่รอครบเวลา 2 ชั่วโมง ให้นำเซลล์มะเร็งที่ทำการอดอยากข้ามคืนออกมาจากตู้บ่ม แล้วนำมาล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์ 0.25% ทริปซินลงไป 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที ก่อนที่จะปิเปตต์ทริปซินออกให้หมด นำไปเข้าตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้นำเซลล์ออกมาใส่ 1% FBS working DMEM ลงไปจำนวน 2

มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลายเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ก่อนที่จะเขย่าให้เซลล์เข้ากัน นำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปทำการนับเพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณเซลล์ที่ต้องปิเปตต์ต่อหลุมในขั้นต่อไป โดยปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้ต่อ insert คือ $5x10^4 - 1x10^5$ เซลล์/500 ไมโครลิตร/insert

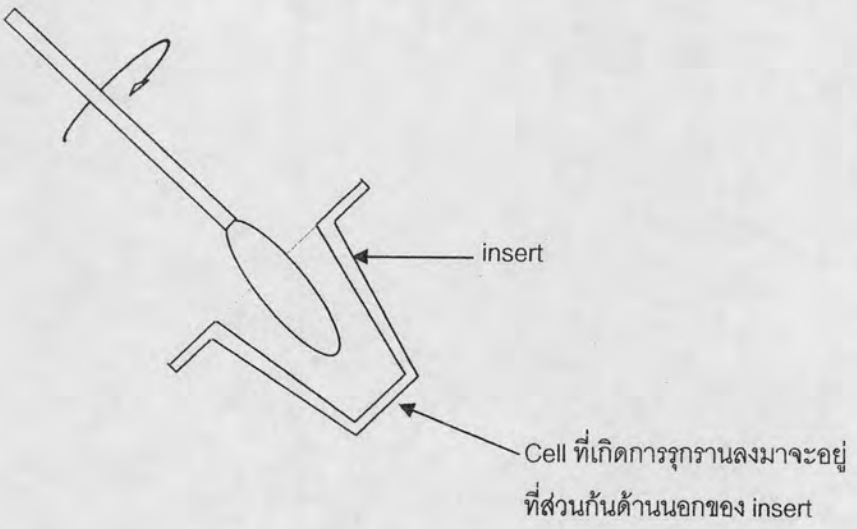
เมื่อทราบปริมาณสารละลายเซลล์ที่ต้องปิเปตต์ในแต่ละหลุมแล้ว ให้เตรียมสารสกัด ณ ความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการทดสอบ โดยสารสกัดนี้จะถูกนำไปผสมกับสารละลายเซลล์ที่คำนวณ โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 600 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง เพื่อผสมสารละลายเซลล์และสารสกัดแอปเปิ้ล ณ ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่ต้องการให้เข้ากัน เมื่อครบกำหนดเวลา 2 ชั่วโมงแล้ว ให้ปิเปตต์ 1% FBS working DMEM ออกจาก insert ให้มากที่สุด ทั้งนี้ต้องระวังไม่ให้ปลาย tip ของ autopipette ที่ใช้นั้น จิ้มลงไปโดน insert โดยตรง เพราะอาจเป็นสาเหตุของการขาดของ insert ที่ถูกเคลือบด้วย Matrigel ได้ จากนั้นปิเปตต์สารละลายเซลล์ในสารสกัดที่ได้เตรียมไว้ลงไปใน insert จำนวน 500 ไมโครลิตร โดยต้องระวังเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้น โดยในการทดลองดูการรุกรานของเซลล์มะเร็งในแต่ละความเข้มข้นนั้น จะถูกทำซ้ำความเข้มข้นละ 2 insert

เมื่อปิเปตต์สารละลายที่ได้เตรียมไว้จนครบแล้ว จากนั้นให้ปิเปตต์ DMEM ที่มีส่วนผสมของ 10% FBS ลงไปที่ก้น 24 well Companion plate จำนวน 1 มิลลิลิตร ทั้งนี้ต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นใต้ก้น insert เพราะฟองอากาศที่เกิดขึ้นนี้อาจไปขัดขวางการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบได้ จากนั้นนำ 24 well Companion plate ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งระบบของการทดลองเรื่อง invasion assay ของบริษัท Beckton-Dickinson นี้สามารถแสดงให้เห็นได้ดังรูปต่อไปนี้



ภาพที่ 14 : **ชุด** invasion assay **ของบริษัท** Beckton-Dickinson

วันที่ 3 ของการทดลองของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว ให้นำเซลล์ (plate A) ออกมาจากตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเตรียม plate อีก plate หนึ่ง (plate B) ปิเปตต์ 70% เอธานอล ลงไปหลุมละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นให้ทำการย้าย insert จาก plate A ลงไปในแต่ละหลุมของ plate B ที่ทำการปิเปตต์ 70% เอธานอลที่เตรียมเอาไว้ จับเวลาทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง โดยในขั้นตอนนี้จะเป็นการ fix เซลล์มะเร็งที่ทำการรุกรานลงมาอยู่ข้างใต้ก้นของ insert เมื่อถึงเวลาที่กำหนดให้เปิดน้ำประปาให้ไหลผ่าน plate B เพื่อไล่เอา 70% เอธานอลออก โดยปล่อยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้ทำการคว่ำ plate B เพื่อไล่น้ำออก ปิเปตต์ Hematoxylin จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไปใน plate แรก (plate A) และย้าย insert ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อทำการย้อมสี เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดย Hematoxylin จะติดสีในส่วนของเซลล์ที่เป็นเบส จากนั้นให้เปิดน้ำประปาให้ไหลผ่าน plate A เป็นเวลา 5-10 นาทีเพื่อไล่สี Hematoxylin ออก เมื่อครบกำหนดเวลาให้ทำการคว่ำ plate A เพื่อไล่น้ำออก ใช้สำลีก้านพันปลายไม้ เช็ดที่ด้านในของก้น insert ตามภาพที่ 15 เบาๆ เพราะอาจทำให้ก้น insert ทะลุได้ เพื่อเช็ดเซลล์ที่ไม่ได้รุกรานลงไป ออกให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้



ภาพที่ 15 : แสดงการเช็ดเซลล์ที่ด้านในของ insert

จากนั้นปิเปตต์ Eosin จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไปใน plate แรก (plate A) และย้าย insert จาก plate B ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อทำการย้อมสี เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดย Eosin จะติดสีในส่วนของเซลล์ที่เป็นกรด นำไปล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 5-10 นาทีเช่นเดิม จากนั้นคว่ำ plate A เพื่อไล่น้ำประปาออก ใช้สำลีพันปลายก้านเช็ดที่ด้านในอีกครั้ง ก่อนที่จะคว่ำบนกระดาษทิชชูเป็นเวลา 30 นาที เพื่อปล่อยให้ insert แห้ง

เมื่อ insert แห้งดีแล้ว ให้ใช้ปลายคัตเตอร์หัวเล็ก กรีดที่ก้นของ insert คีบส่วนก้นที่ตัดออกมาวางบนแผ่นสไลด์ จากนั้นปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ผนึกแต่ละด้านของกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บใสตามภาพที่ 16 โดยในขั้นตอนนี้ต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนำแผ่นสไลด์ที่ได้ไปทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่ลงไปยังพื้นผิวด้านล่างของ insert ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า โดยในการนับแต่ละครั้ง จะแบ่งพื้นที่ insert ออกเป็น 4 ส่วน ซึ่งในแต่ละส่วนนั้นจะต้องนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดส่วนละ 2 พื้นที่ (fields) รวมทั้งสิ้น 1 insert จะนับเซลล์ทั้งหมด 8 พื้นที่ด้วยกัน จากนั้นนำค่าที่ได้ในแต่ละพื้นที่มาหาร 8 เพื่อหาค่าเฉลี่ย

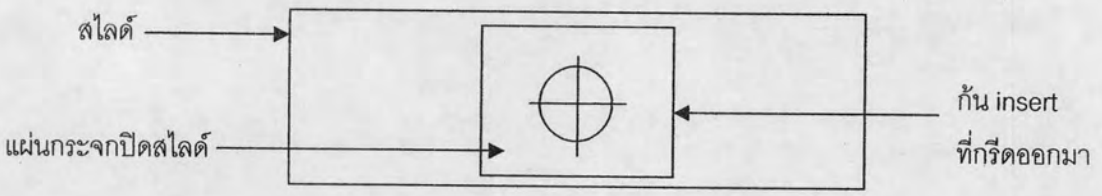
$$\text{จำนวนเซลล์ที่เกิดการรุกรานในแต่ละความเข้มข้น} = \frac{\text{no. of cell}_1 + \text{no. of cell}_2 + \ldots + \text{no. of cell}_8}{\text{จำนวนพื้นที่ที่ใช้นับ (field)}}$$

$\text{no. of cell}_{1\text{-}8}$ = จำนวนเซลล์ที่นับได้ในแต่ละพื้นที่ (เซลล์)

จำนวนพื้นที่ที่ใช้นับ = ในที่นี้คือ 8 พื้นที่

และนำค่าที่ได้จากการทำซ้ำ (Duplicate) ในแต่ละความเข้มข้น มาหาร 2 เพื่อหาค่าเฉลี่ยอีกครั้ง และนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อทำการเทียบเป็น % invasion

เมื่อได้ช่วงค่า IC_{50} แล้ว ให้นำความเข้มข้นนั้นมาทำการทดลองนี้ซ้ำอีกครั้ง โดยในคราวนี้จะทดสอบในแต่ละชุดความเข้มข้นเป็นแบบความเข้มข้นละ 3 insert (Triplicate) สำหรับเซลล์มะเร็ง SW480 นั้น จะทำตามวิธีเดียวกับวิธีทำในวันที่ 3 ของเซลล์มะเร็ง HeLa นั่นเอง แต่จะทำในวันที่ 5 นับจากวันแรกที่ทำการเคลือบ matrigel ลงบน membrane



ภาพที่ 16 : แสดงสไลด์ที่พร้อมนับจำนวนเซลล์ที่สามารถรุกราน

3.13 การวัดการแสดงออกของเซลล์มะเร็ง

ในเรื่องของการวัดการแสดงออกยีน RAGE ในเซลล์มะเร็งที่นำมาทำการทดสอบนั้น จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction หรือ ที่เรียกสั้นๆว่า RT-PCR โดยในการทดลองนี้จะเริ่มตั้งแต่ในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง บ่มกับสารสกัด ณ ความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่ได้จากในการทดลองในเรื่องของการรุกรานของเซลล์มะเร็ง สกัดอาร์เอ็นเอของเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปเข้าสู่กระบวนการ Reverse transcription เพื่อเปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ให้กลายเป็นสาย cDNA ก่อนที่จะนำสาย cDNA ไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR และนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรสิส ซึ่งวิธีการทดลองสามารถกล่าวได้โดยละเอียดดังต่อไปนี้

3.13.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ในการทดลอง

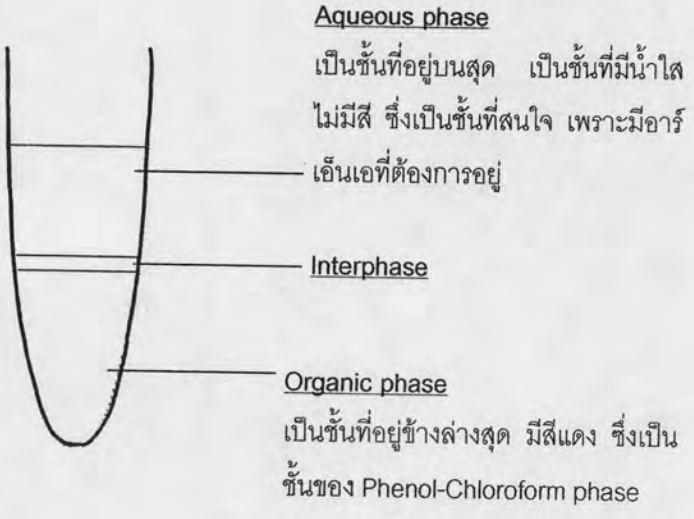
ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้ในการทดลองเรื่องการวัดการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบนั้น จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในจานเพาะเลี้ยงที่มีขนาด 100 mm x 20 mm โดยใช้ 1% FBS working DMEM เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งนี้จะใช้จำนวนเซลล์ทั้งหมดจำนวน 1×10^6 เซลล์ในปริมาตรโดยรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.13.2 การบ่มสารสกัดแอปเปิ้ลกับเซลล์มะเร็ง

เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ให้ทำการล้างเซลล์มะเร็งด้วย PBS 5 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้งก่อนที่จะปิเปตต์สารสกัดที่ถูกเตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการด้วย 1% FBS working DMEM โดยความเข้มข้นที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เป็นความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในเรื่องของ การรุกรานของเซลล์มะเร็ง ซึ่งปริมาตรสุดท้ายคือ 10 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยงนั่นเอง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.13.3 การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์มะเร็ง

เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ให้ทำการล้างเซลล์มะเร็งด้วย PBS ที่เย็นจำนวน 5 มิลลิลิตรทั้งหมด 2 ครั้ง โดยให้ทำบนกระติกน้ำแข็ง จากนั้นให้เติมน้ำยา TRIZOL® ลงไปจำนวน 2 มิลลิลิตร ปิเปตต์ขึ้นลงเพื่อทำการฉีดล้างเซลล์ที่เกาะให้หลุดลงมา แล้วจึงไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปิเปตต์สารละลาย lysate ที่ได้ ใส่ลงในคลอโรฟอร์มที่แช่เย็นไว้ก่อนหน้านี้ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ทั้งหมด 2 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยขั้นตอนที่กล่าวมาทั้งหมด ให้ทำบนกระติกน้ำแข็ง นำสารละลายเซลล์ไปทำการ vortex หรือเขย่าแรงๆ ด้วยมือนาน 15 วินาที นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะนำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยความเร็ว 12,000 G (RCF) เมื่อครบเวลาแล้วจะได้สารละลายแยกเป็น 3 ชั้นตามภาพดังต่อไปนี้



ภาพที่ 17 : **การแยกชั้นของสารละลายเซลล์เมื่อทำการสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยน้ำยา** TRIZOL®

จากนั้นให้ทำการปิเปตต์สารละลายใสชั้นบนสุดมาหลอดละ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี Isopropyl แช่เย็นจำนวน 500 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อใช้ในการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยในขั้นตอนนี้ให้ทำบนกระติกน้ำแข็งเช่นเดียวกัน ทำการ vortex ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบ

กำหนดเวลานำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 G (RCF) 10 นาที เมื่อจบขั้นตอนนี้จะเริ่มสังเกตเห็นอาร์เอ็นเอตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง ให้เทส่วนใส ทิ้งเบาๆ เติม 75% เอธานอล ลงไปจำนวน 1 มิลลิลิตร แล้ว vortex ให้เข้ากัน จากนั้น นำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วไม่เกิน 7,500 G (RCF) เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นนี้ทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างอาร์เอ็นเอ

จากนั้นให้นำหลอดทดลองที่ได้จากการปั่นล้างมาคว่ำลงบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฉีดด้วยน้ำยา RNase Away ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งน้ำยา RNase Away นี้ เป็นน้ำยาที่ใช้ในการทำลายเอนไซม์ RNase ที่มีทั่วไปตามธรรมชาติ ที่อาจมาทำลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ให้เติม RNase-free water หรือ DEPC-water ลงไปจำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตต์ขึ้นลง แล้วนำไปบ่มที่ 55-60 องศาเซลเซียส เพื่อทำการละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ สุดท้ายจะได้สารละลายอาร์เอ็นเอที่พร้อมใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.13.4 การวัดค่า OD (Optical Density) เพื่อหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

นำอาร์เอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนการละลายด้วย RNase-free water แล้วส่วนหนึ่ง มาทำการเจือจางอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 1:500 (อาร์เอ็นเอ:น้ำกลั่น) จากนั้นนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง Spectrophotometry โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร โดยค่า OD_{260} ที่มีค่าเท่ากับ 1.00 นั้นจะเทียบได้กับ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำค่า OD ที่วัดได้ ไปคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$[RNA] = OD_{260} \times 40 \times \text{dilution factor} \times 10^{-3}$$

โดยในที่นี้ Dilution factor = 500

[RNA] ที่ได้ถูกคำนวณให้อยู่ในรูปของ ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

ซึ่งในการวัดค่า OD ของอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวนี้ ควรจะมีอัตราส่วนของค่า OD_{260}/OD_{280} ต้องไม่ต่ำกว่า 2.00 ซึ่งอัตราส่วนนี้แสดงถึงความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นั่นเอง

3.13.5 การ treat RNA เพื่อทำลาย DNase

เป็นการ treat อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยน้ำยา Deoxyribonuclease I (DNase I) จากบริษัท Invitrogen ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมความพร้อมให้กับอาร์เอ็นเอ ก่อนที่จะทำการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอ ให้กลายเป็น cDNA ต่อไป โดยเป็นขั้นตอนที่ใช้ทำลายดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนมาในขั้นตอนของการสกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อไม่ให้มีดีเอ็นเอเข้ามาปนเปื้อนในการทดลองขั้นต่อไปนั่นเอง

ปิเปตต์อาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ลงในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตต์น้ำยาต่อไปนี้ ได้แก่

- 10X DNase I buffer จำนวน 1 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา
- เอนไซม์ DNase I ที่มีความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา
- DEPC-treated water ลงไปจนครบปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา

เขย่าส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 25 mM EDTA ลงไป 1 ไมโครลิตร เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยาของ เอนไซม์ DNase I จากนั้นในขั้นตอนสุดท้ายให้นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ในการทดลองนี้ ไม่ว่าจะเป็นเวลาที่ใช้ในการบ่มหรืออุณหภูมิที่ใช้ก็ตาม จะต้องปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัด เพราะเวลาที่นานเกิน หรืออุณหภูมิที่สูงเกิน อาจนำไปสู่ Mg^{2+}-dependent hydrolysis ของอาร์เอ็นเอได้

3.13.6 การสร้าง first-strand cDNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription

ขั้นตอนนี้เป็นการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่สกัดได้ ให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ cDNA โดยใช้น้ำยา ImProm-II™ Reverse Transcriptase ของบริษัท Promega ซึ่งจะในการทดลองนี้จะสามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อยได้ดังต่อไปนี้

3.13.6.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอเป้าหมาย และ primer

ปิเปตต์อาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 1 ไมโครกรัม ลงไปในแต่ละหลอดทดลอง จากนั้นให้ปิเปตต์น้ำยาดังต่อไปนี้ 50 μM Oligo $(dT)_{17}$ จำนวน 0.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา และสุดท้าย เติม DEPC-treated water ให้ครบจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว ให้รีบนำหลอดทดลองมาให้ความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียสทันที เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที หรือจนกว่าจะปิเปตต์น้ำยาในขั้นตอนต่อไป

3.13.6.2 การทำ Reverse transcription

วางหลอดทดลองไว้บนกระติกน้ำแข็ง จากนั้นให้ปิเปตต์น้ำยา ดังต่อไปนี้

- ImProm-II™ 5X reaction buffer จำนวน 4 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา
- 25mM $MgCl_2$ จำนวน 2.4 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา
- 10mM dNTP จำนวน 1 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา
- RNaseOUT™ ที่มีความเข้มข้น 40 ยูนิต/ไมโครลิตร จำนวน 0.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา
- Improm-II™ Reverse Transcriptase จำนวน 1 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา

สุดท้ายให้เติม DEPC-treated water ไปจนครบ 15 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งจะเป็นขั้นตอนของการ Annealing เมื่อครบกำหนดเวลาให้นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ซึ่งจะเป็นขั้นตอนของการ Extension และในขั้นตอนสุดท้ายให้นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ImProm-II™ Reverse Transcriptase ด้วยความร้อน

3.13.7 การเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยเทคนิค Ploymerase Chain Reaction (PCR)

ในการทดลองนี้เป็นการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือที่เรียกว่า Polymerase Chain reaction

ปิเปตต์ cDNA ลงไปจำนวน 4 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยาสำหรับยีน RAGE และจำนวน 1 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยาสำหรับยีน β-actin ที่ใช้เป็นตัวแทนของ House-keeping Gene จากนั้นให้ปิเปตต์ชุดน้ำยาจากบริษัท Invitrogen ดังต่อไปนี้ 10X buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา dNTP จำนวน 0.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา แมกนีเซียมคลอไรด์($MgCl_2$) จำนวน 0.75 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา Forward-primer และ Reverse-primer เส้นละ 0.125 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา Taq DNA polymerase จำนวน 0.125 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา และสุดท้าย เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไป spin down ก่อนที่จะนำไปสู่เครื่อง Thermocycler เพื่อทำการเพิ่มจำนวนที่อุณหภูมิต่างๆตามที่ได้ตั้งไว้ ตามตาราง ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3 : **ตารางแสดง** PCR condition

ขั้นตอน	องศาเซลเซียส		ระยะเวลา	จำนวนรอบ
	G82S	β-actin		
Pre-heat	94	94	5นาที	1
Denature	94	94	30 วินาที	
Annealing	60	58	40 วินาที (RAGE) 30 วินาที (β-actin)	35 (RAGE) 30 (β-actin)
Extension	72	72	1 นาที	
Final extension	72	72	10 นาที	1
Hold temp	4	4	∞	-

ตารางที่ 4 : **ลำดับเบสและขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก** primer **แต่ละตัวในขั้นตอนของกระบวนการ** RT-PCR

ยีน	primer	Sequence	ขนาดผลผลิต (bp)
G82S	reverse	5'-GGCCAAGGCTGGGGTTGAAGG-3'	397
	forward	5'-GTAAGCGGGGCTCCTGTTGCA-3'	
β-actin	reverse	5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATG-3'	863
	forward	5'-ACGGGTCACCCACACTGTGC-3'	

3.13.8 **การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรสิส**

นำผลผลิตจากขั้นตอน PCR มาทำการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรสิส โดยใช้ วุ้น2.5% อะกาโรส และใช้ 0.5X buffer เป็นตัวนำประจุไฟฟ้า โดยเติมให้ท่วมแผ่นวุ้นอะกาโรส ในการให้กระแสไฟฟ้าผ่านวุ้นอะกาโรสในแต่ละครั้งนั้น จะต้องเติม loading

dry ใส่ลงในแต่ละหลอดทดลองของยีน RAGE หลอดละ 5 ไมโครลิตร ส่วนผลผลิตของยีน β-actin นั้นให้นำมาทำการเจือจางตามอัตราส่วนต่อไปนี้

-	ผลผลิตดีเอ็นเอ	2	ไมโครลิตร
-	น้ำกลั่น	5	ไมโครลิตร
-	loading dry	5	ไมโครลิตร

ซึ่งจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12 ไมโครลิตร ทั้งนี้เหตุที่ต้องนำผลผลิตของยีน β-actin มาทำการเจือจางนั้น เนื่องจากผลผลิตของยีน β-actin ที่ได้จากขั้นตอน PCR จะมีความเข้มข้นสูงมาก ถ้านำไปวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรสิส โดยไม่ผ่านการเจือจาง จะทำให้ได้แถบผลผลิตที่เข้มมาก (saturate) ซึ่งเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Alphalmager 2000 จะทำให้ค่าที่อ่านได้มีความคลาดเคลื่อนไปจากค่าที่แท้จริง

ต่อจากนั้น ให้ผสมดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้เข้ากัน ก่อนที่จะนำไป spin down จากนั้นให้ทำการปิเปตต์ดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่าง ลงในแต่ละหลุมที่เกิดจากหวีที่ใส่ในขั้นตอนของการเตรียมวุ้น 2.5% อะกาโรส ตัวอย่างละ 28 ไมโครลิตรสำหรับหลอดทดลองของยีน RAGE และตัวอย่างละ 11 ไมโครลิตรสำหรับหลอดทดลองของยีน β-actin

ในขั้นตอนสุดท้ายก่อนที่จะให้กระแสไฟฟ้านั้นเอง ให้ปิเปตต์ DNA ladder ซึ่งเป็น marker ที่สามารถใช้เทียบได้ว่า แถบของ PCR product ที่ได้นั้น มีค่า Molecular Weight เท่าไหร่ จากนั้นนำไปให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 90 โวลต์ ด้วยความต่างศักย์ที่คงที่เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำวุ้นไปย้อมสี Ethidium bromide โดย Ethidium bromide นี้ จะเข้าไปแทรก (intercalate) ระหว่างคู่เบสที่ซ้อนกันอยู่ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำวุ้นไป destain อีกเป็นเวลา 20 นาที ก่อนที่จะนำวุ้นที่ผ่านการย้อม Ethidium Bromide ไปวิเคราะห์ด้วยรังสี UV และถ่ายรูปแถบผลผลิต PCR เพื่อที่จะนำไฟล์ข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Alphalmager 2000 ต่อไป

3.14 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) และคำนวณข้อมูลที่ได้จากการวิจัย เพื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลที่ได้จากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยวิธีทางสถิติที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล คือ one-way ANOVA (Analysis of Variance) ด้วยโปรแกรม SPSS (version 11.5 for Window) โดยค่า $p < 0.05$ จะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ