บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific Co.,Ltd	เกาหลีใต้
2. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น FINE VORTEX	FINEPCR	เกาหลีใต้
3. เครื่อง Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs) รุ่น DNA110-230	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)	Memmert	เยอรมนี
5. เครื่อง Block Heater รุ่น HB-1 และ HB-2	Wealtec Corp.	สหรัฐอเมริกา
6. ตู้แช่แข็ง -20 °C (Top Open Chest Freezer)	SANYO Electric Co.,Ltd	ญี่ปุ่น
7. ตู้แช่แข็ง -80 °C (ULT Deep Freezer) รุ่น DF8524	ilShin Lab Co.,ltd.	เกาหลีใต้
8. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PTC-200	MJ Research, Inc.	สหรัฐอเมริกา
10. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
11. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PX2	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. ชุดถ่ายภาพเจล (Transilluminator และ Doc-Print)	VILBER LOURMAT	ฝรั่งเศส
13. เครื่องถ่ายภาพเจล (GEL DOC 1000)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
14. ตู้อบ (Incubator Shaker) Minitron	Appropriate Technical Resources, Inc.	สหรัฐอเมริกา
15. เครื่อง Suction รุ่น Pumpe 4010	Boehringer Mannheim	เยอรมนี
16. เครื่อง Cryocentrifuge รุ่น Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Products	เยอรมนี
17. ตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 (CO_2 Incubator)	Sheldon Manufacturing Inc.	สหรัฐอเมริกา
18. ตู้อบ (Incubator)	Memmert	เยอรมนี
19. ตู้ปลอดเชื้อ (Class II Biosafety Cabinet) รุ่น NapFLOW	Thermo Scientific, Inc. (Napco)	สหรัฐอเมริกา
20. ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Flow Cabinet)	E.S.I. FLUFRANCE	ฝรั่งเศส

21. เครื่องวัดแสง luminescence (Luminometer) รุ่น VICTOR^3	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
22. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น UV-1601	SHIMADZU	ญี่ปุ่น
23. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOLEDO	สวิสเซอร์แลนด์
24. ถัง Liquid Nitrogen รุ่น XT20	TAYLOR-WHARTON	สหรัฐอเมริกา
25. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	**บริษัทผู้ผลิต**	**ประเทศ**
1. Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml) และ PCR tube	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
2. Centrifuge tube (ขนาด 15 ml และ 50 ml)	BioLogix Research	สหรัฐอเมริกา
3. Oak Ridge Centrifuge tube (ขนาด 50 ml)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
4 Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 µl)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
5. BARRIERTIPS (ขนาด 20, 200, 1000 µl)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
6. Auto pipette (ขนาด 20, 200, 1000 µl)	GILSON	ฝรั่งเศส
7. Auto pipette (ขนาด 20 µl)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
8. Pipette Aid รุ่น Portable XP	Drummond Scientific	สหรัฐอเมริกา
9. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri Dishes)	Bibby Sterilin Ltd.	อังกฤษ
10. Luminometer Plate	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
11. Cell Culture Flask (ขนาด 25 cm^2 และ 75 cm^2)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. Disposable Serological pipette (ขนาด 5 ml และ 10 ml)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
13. Pasteur pipette	COPAN innovation	สหรัฐอเมริกา
14. Cryovial tube (ขนาด 2 ml)	Simport plastics	แคนาดา
15. Cell Culture Dish (ขนาด 100mm X 20mm)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
16. 96 Well Cell Culture Cluster, Flat Bottom with Lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
17. SUB CELL รุ่น Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา

18. SUB CELL รุ่น Wide Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
19. เครื่อง Power Supply รุ่น POWER PAC 200 และ 300	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
20. เครื่อง Power Supply รุ่น SX250 MightySlim PSU.	Hoefer, Inc.	สหรัฐอเมริกา

สารเคมี	**บริษัทผู้ผลิต**	**ประเทศ**
1. ชุดน้ำยา FlexiGene DNA Kit	QIAGEN	เยอรมนี
2. Ethidium Bromide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
3. 2-Propanol	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
4. Absolute Ethanol	MERCK	เยอรมนี
5. GenePure LE Agarose	ISC BioExpress	สหรัฐอเมริกา
6. ชุดน้ำยา MasterTaq® Kit	Eppendorf	เยอรมนี
7. ชุดน้ำยา *Taq*PCRx DNA polymerase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
8. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอจากเจล (Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
9. Sterile Water (deionized water)	General Hospital Products Public Co., Ltd	ประเทศไทย
10. ชุดน้ำยา pGEM®-T Easy Vector System	Promega	สหรัฐอเมริกา
11. เอนไซม์ *Kpn*I, *Hin*dIII และ 100 bp ladder	New England Biolabs, Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. ชุดน้ำยา T4 DNA Ligase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
13. Tryptone Peptone	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
14. Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
15. BACTO-AGAR	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
16. AMPILIN (Amplicilin,Ampicilin Sodium)	Atlantic Laboratories Corp. Ltd	ประเทศไทย
17. Sodium chloride	MERCK	เยอรมนี
18. Calcium chloride dehydrate	MERCK	เยอรมนี
19. Magnesium chloride	APS Finechem	ออสเตรเลีย
20. Sodium acetate	MERCK	เยอรมนี
21. Potassium acetate	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
22. Tris Base	Promega	สหรัฐอเมริกา
23. Orthoboric acid	BDH	อังกฤษ

24. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	BDH	อังกฤษ
25. Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagenti	อิตาลี
26. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
27. ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
28. RIBONUCLEASE A	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
29. น้ำยา TRIZOL® Reagent	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
30. ชุดน้ำยา SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
31. RNase AWAY (for RNase Decontamination)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
32. เอนไซม์ Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
33. Chloroform	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
34. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
35. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 4.00 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
36. Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) Medium with 2.05 mM L-Glutamine	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
37. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS Modified) without Calcium, Magnesium	JRH Biosciences	สหรัฐอเมริกา
38. Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
39. HyQ Trypsin 0.25 % with EDTA with 2.5 g Porcine Trypsin without Calcium, Magnesium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
40. Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
41. Fungizone Amphotericin B 250 µg/ml	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
42. Dimethyl Sulfoxide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
43. Dexamethasone-Water Soluble Cell Culture	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
44. β-estradiol-Water Soluble Cell Culture	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา

45. ชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
46. ชุดน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega	สหรัฐอเมริกา

3.2 ตัวอย่าง

3.2.1 ประชากรและการเก็บตัวอย่าง

ผู้บริจาคโลหิตจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และอาสาสมัครนิสิตจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นประชากรไทยที่มีสุขภาพดี โดยที่อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้นั้น จะต้องกรอกรายละเอียดลงในแบบฟอร์มใบยินยอมด้วยความสมัครใจให้ทำการวิจัยในมนุษย์ จากนั้นจึงทำการเจาะเก็บโลหิตจำนวนประมาณ 10 ml เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอตามกระบวนการทำต่อไป

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

นำตัวอย่างเลือดที่ทำการเก็บจากอาสาสมัคร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา FlexiGene DNA Kit (QIAGEN) โดยใช้หลักการ alkaline lysis ในการสกัด เริ่มจากปิเปตต์เลือดครบส่วน (whole blood) ปริมาตร 100 µl ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube เติม Buffer FG1 ลงไป 250 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาประมาณ 5 ครั้ง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 1 นาที เสร็จแล้วเทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นเติม Buffer FG2 ที่ผสมกับ QIAGEN Protease ในอัตราส่วน 1:100 (Protease : Buffer FG2) แล้วลงในหลอดทดลองปริมาตร 50 µl นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาที จะเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อครบเวลา จากนั้นเติม 100% Isopropanol ลงไป 50 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาประมาณ 20 ครั้ง จนกว่าจะเห็นตะกอนของดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 3-5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 70 % Ethanol 50 µl ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 3-5 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง Speed Vac ขั้นสุดท้ายละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Buffer FG3 ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายใน Buffer หมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.2.3 การตรวจหาความหลากหลายของยีน SERT ชนิด 5-HTTLPR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ตรวจหาชนิดอัลลีลของ 5-HTTLPR ด้วยเทคนิค Touchdown PCR ในหลอดทดลอง (PCR tube) โดยใช้ชุดน้ำยา MasterTaq® Kit (Eppendorf) และ primers ที่จำเพาะซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ Forward primer (5'-GGC GTT GCC GCT CTG AAT TGC-3') และ Reverse primer (5'-GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC-3') (21) ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่สกัดได้ปริมาตร 2 µl กับ 23 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x TaqMaster, 1x Taq Buffer / Mg^{2+} (500 mM KCL, 100 mM Tris-HCL pH 8.3, 15 mM $Mg(OAc)_2$), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U Taq DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 1 นาที; 68.0 °C-0.5 °C 1 นาที; 72.0 °C 1 นาที (25 รอบ), 94.0 °C 1 นาที; 50.0 °C 1 นาที; 72.0 °C 1 นาที (10 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ) แล้วจึงตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 3 % (3 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล หากแถบของดีเอ็นเอบนเจลมีขนาดประมาณ 484 คู่เบสจะเป็น 5-HTTLPR ชนิด S อัลลีล และขนาดประมาณ 528 คู่เบสจะเป็น 5-HTTLPR ชนิด L อัลลีล

3.2.4 การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

เมื่อทราบชนิดอัลลีลของ 5-HTTLPR แล้ว จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีชนิด S อัลลีลและชนิด L อัลลีลมาอย่างละ 1 ราย เพื่อทำการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของทั้งสองอัลลีลประมาณ 44 คู่เบส โดยเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ขนาดประมาณ 484 คู่เบสของชนิด S อัลลีล และขนาดประมาณ 528 คู่เบสของชนิด L อัลลีล นำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 60 ng ในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 15 µl จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทั้งสองอัลลีลนี้ ไปหาลำดับเบส ณ ห้องปฏิบัติการของ ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ชุดน้ำยา ABI Sequencing kit (ABI, Fostercity, CA) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyser (ABI, Fostercity, CA) และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้นั้นกับลำดับเบสใน GenBank accession No. AF117826 และ No. X76753 ตามลำดับ

3.3 **การโคลนนิ่ง** (Cloning)

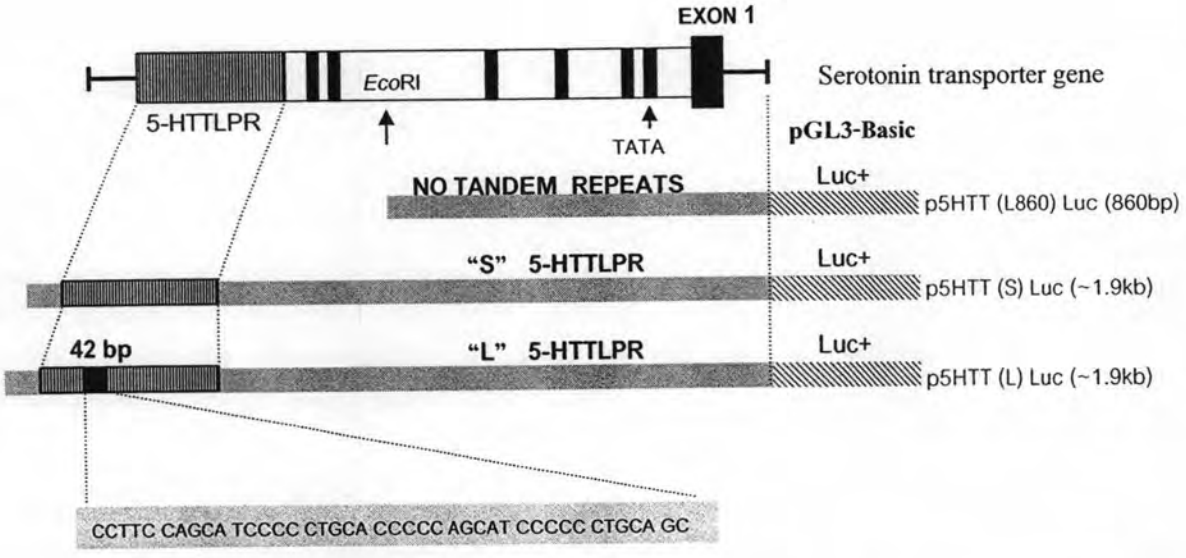
3.3.1 **การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการโคลน** (Insert DNA) **ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส** (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (Insert DNA) สำหรับใช้การโคลนนั้น เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการใช้มีปริมาณเบส G และเบส C เป็นจำนวนมาก (GC-rich) ทำให้การเตรียมโดยใช้ Conventional PCR ตามปกติค่อนข้างจะมีความลำบาก คณะผู้วิจัยจึงได้ปรับปรุงเทคนิคขึ้นมาโดยใช้ชุดน้ำยา *Taq*PCRx DNA polymerase (Invitrogen) เพื่อแก้ปัญหา และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลักษณะของ 5-HTTLPR แตกต่างกัน ทั้ง S และ L อัลลีล คือ Forward primer (5'-CAA AGG TAC CGT TGC CGC TCT GAA TGC CAG-3') และ Reverse primer (5'-CCG AAG CTT GAA ACG TGG GTT CGA GGC GGA GAG-3') กับ primers ที่จำเพาะสำหรับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ขาดลักษณะของ 5-HTTLPR คือ Forward primer (5'-CAA GGT ACC GAA TTC CTG GGC TCA AGC AAT CCT-3') และ Reverse primer (5'-CCG AAG CTT GAA ACG TGG GTT CGA GGC GGA GAG-3') เริ่มจากทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่สกัดได้ปริมาตร 2 µl กับ 23 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 2x PCRx Enhancer Solution, 1x PCRx Amplification Buffer (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL), 1.5 mM $MgSo_4$, 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 95.0 °C 2 นาที (1 รอบ), 95.0 °C 30 วินาที; 60.0 °C 30 วินาที; 68.0 °C 2 นาที (35 รอบ); 68.0 °C 10 นาที (1 รอบ) เสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 1 % (1 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล โดยแถบของดีเอ็นเอบนเจลจะมีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR และขนาด 860 คู่เบส ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR หลังจากนั้นทำการสกัดแยกเฉพาะชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล ด้วยชุดสกัด Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column (BIO-RAD) โดยใช้ใบมีดตัดเจลที่มีแถบของดีเอ็นเอที่ต้องการ สับเจลให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงใน Column จากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 3 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด ขั้นตอนสุดท้ายนำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น โดยปิเปตต์สารละลายดีเอ็นเอ

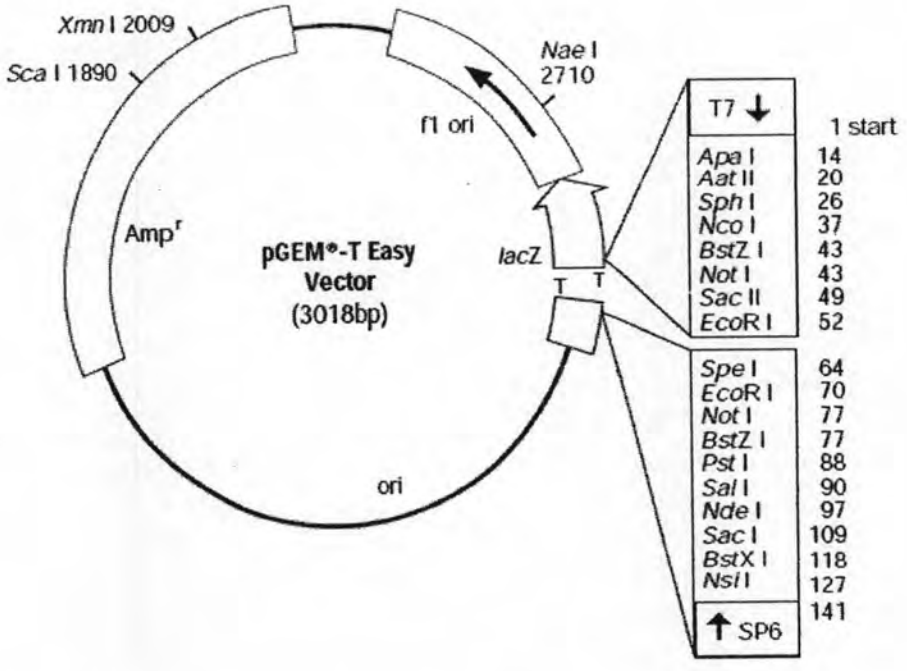
ที่สกัดแยกได้มาวัดปริมาตรแล้วเติมน้ำให้ครบ 100 µl ผสมให้เข้ากันกับ 3 M NaAC pH 5.0 ปริมาตร 10 µl และ 100 % Ethanol ปริมาตร 220 µl วางตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 70% Ethanol 200 µl ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 ^{o}C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C

3.3.2 การสร้างดีเอ็นเอพลาสมิด (luciferase reporter gene constructs)

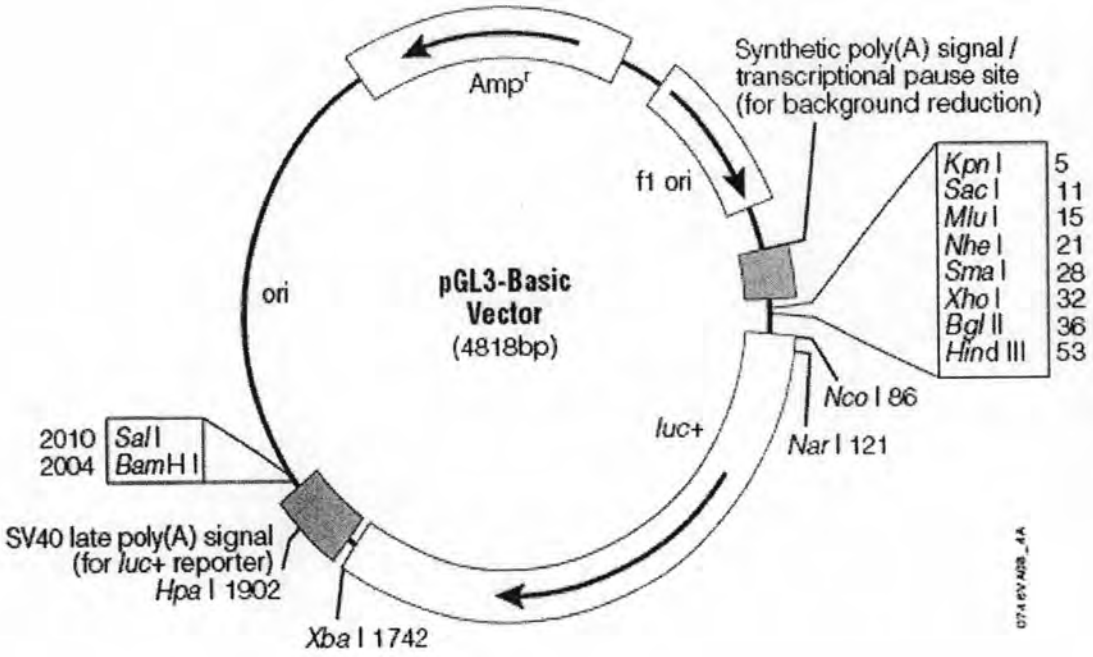
เมื่อเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบสและขนาด 860 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR และไม่มีความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (L860) ได้แล้ว จะทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนเหล่านั้นกับ Plasmid Vector ที่ขาดส่วนของ promoter (promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Robert K. Yu, Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Georgia's Health Science University, USA) (21, 280) แต่เนื่องจากการโคลนโดยเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector โดยตรงนั้นมีโอกาสสำเร็จค่อนข้างน้อย คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจที่จะโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ TA Vector ก่อน ซึ่งใช้ชุดน้ำยา pGEM®-T Easy Vector System (Promega) มีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 5ng pGEM®-T Easy Vector, 3 Weiss units T4 DNA Ligase ผสมให้เข้ากันกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ข้ามคืน โดยแสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เตรียมนั้นไว้ดังรูปที่ 3.1 ลักษณะของ pGEM®-T Easy Vector ดังรูปที่ 3.2 และลักษณะของ pGL3-Basic Vector ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน โดยส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR จะมีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส และส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (*Eco*RI deletional mutant) จะมีขนาด 860 คู่เบส (L860)



รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะของ TA Vector หรือ pGEM®-T Easy Vector
(http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1473va&partno=A1360&product=pGEM%3Csup%3E%26%23x00AE%3B%3C%2Fsup%3E%2DT+Easy+Vector+System+I)



รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะของ promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic (http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=0746va&partno=E1751&product=pGL3%2DBasic+Vector)

สำหรับการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector นั้นจำเป็นที่จะต้องให้ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและ Vector สามารถเชื่อมต่อกันได้อย่างจำเพาะ โดยทั้งคู่จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I (NEB) และ *Hin*dIII (NEB) สำหรับปลายแต่ละข้าง ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7.9), 1x BSA, 1 U *Kpn*I, 1 U *Hin*dIII และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หรือ pGL3-Basic Vector ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector โดยใช้ชุดน้ำยา T4 DNA Ligase (Invitrogen) มีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x DNA Ligase Reaction Buffer (250 mM Tris-HCL pH 7.6, 50 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 %(w/v) polyethylene glycol-8000), 1 U T4 DNA Ligase, pGL3-Basic Vector และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปลายทั้งสองข้างถูกตัดแล้ว นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน

3.3.3 การนำดีเอ็นเอพลาสมิด (Plasmid DNA) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation)

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α และใช้ $CaCl_2$ เพื่อเพิ่ม permeability ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ในการเตรียมเซลล์ให้พร้อม (competent cell) ก่อนที่จะทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ขั้นตอนการเตรียมเซลล์นั้นจะเริ่มต้นจากเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (LB broth) จำนวน 5 ml ข้ามคืน วันต่อมานำมาเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มจำนวนใน 25 ml LB broth โดย incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ในตู้อบ (shaking incubator) จนวัดความขุ่นของเซลล์ (OD_{590}) ได้ค่าประมาณ 0.375 ซึ่งจะใช้เวลานาน 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ที่ได้มีการเจริญอยู่ในช่วงของ early log phase หรือระยะทวีคูณ จากนั้นย้ายเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดใส่ลงใน centrifuge tube (prechilled) นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเหลือเฉพาะตะกอนเซลล์ เสร็จแล้วค่อยๆ เติมสารละลาย 0.1 M $MgCl_2$ ปริมาตร 12.5 ml ลงไปในหลอดและเขย่าหลอดเบาๆ เพื่อให้ทุกเซลล์โดนสารละลายทั่วกัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนเซลล์แล้วเติมสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 12.5 ml เขย่าเบาๆ และนำไปปั่นอีกครั้ง สุดท้ายละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ใน 0.1 M $CaCl_2$ ที่ผสม 15 % glycerol ปริมาตร 4 ml จะได้เซลล์ที่พร้อมทำการถ่ายโอน และแบ่งเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้ไว้ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดละ 200 µl โดยสามารถนำมาใช้ได้เลยหรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C เมื่อเตรียมเซลล์ได้แล้วจึงเริ่มทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิด ซึ่งในการทดลองนี้จะเป็นชิ้นส่วนขนาดต่างๆ ของดีเอ็นเอที่ศึกษากับ pGL3-Basic Vector หรือ pGEM®-T Easy Vector โดยปิเปตต์ดีเอ็นเอพลาสมิดที่ต้องการถ่ายโอนนี้ปริมาตร 10 µl ลงในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ซึ่งผ่านการเตรียมแล้ว ผสมให้เข้ากันเบาๆ และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาย้ายหลอดไปจุ่มใน block heater อุณหภูมิ 42 °C นาน 90 วินาที ระหว่างนี้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะถูกทำให้เปิดกว้างขึ้นสามารถที่จะรับดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้ แล้วรีบเติม LB broth ลงไป 800 µl เลี้ยงเซลล์ต่ออีก 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) หลังจากนั้นปิเปตต์เซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนแล้ว 100 µl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (LB agar) ที่มีแอมพิซิลิน (100 µg/µl amplicilin) ผสมอยู่ แล้วใช้แท่งแก้ว spreader หมุนให้ทั่วหน้าอาหารแข็งเพื่อให้เชื้อกระจายได้ดี นำจานเพาะเชื้อไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้อบเป็นเวลา 1 คืน

3.3.4 การสกัดพลาสมิด (Plasmid DNA) จากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณที่น้อยและอาศัยด่างในการสกัด (Alkaline Lysis Miniprep)

หลังจากถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแล้ว จะต้องทำการเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อนั้นมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนใน LB broth และนำมาสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ก่อน เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการนั้นมาศึกษาต่อไป ซึ่งการสกัดพลาสมิดในการทดลองนี้เป็นการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาตรที่น้อยมาก และอาศัยด่างในการสกัด เรียกวิธีนี้ว่า alkaline lysis miniprep เริ่มต้นจากการปั่นเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนใน LB Broth ปริมาตร 1 ml ที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ใน Buffer P1 (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 µg/ml RNase A) ปริมาตร 330 µl และ Buffer P2 (0.2 M NaOH, 10 % SDS) ปริมาตร 380 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จึงเติม Buffer P3 ที่เย็น (iced-cold 3 M potassium acetate (KAc) pH 5.5) ปริมาตร 380 µl แช่หลอดไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 9,500 rpm นาน 10 นาที และเก็บเฉพาะส่วนใสมาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอต่อโดยเติม 100 % Isopropanol ลงไป 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำหลอดไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm นาน 10 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด ล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 200 µl นำไปปั่นอีกครั้งและตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ทั้งนี้อาจสามารถตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งเพื่อให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นได้ด้วย 3 M ammonium acetate หรือ sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 20 µl กับ 100 % Ethanol ปริมาตร 440 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หรือที่ -70 °C ข้ามคืน แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 13,500 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol อีกครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) สุดท้ายละลายในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 30-50 µl ตามต้องการและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3.5 การตรวจสอบโคลน (Colony Screening) โดยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการนั้น เนื่องจากดีเอ็นเอพลาสมิดที่ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เกิดจากเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector หรือ pGEM®-T Easy Vector

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I (NEB) และ *Hind*III (NEB) ดังนั้นในการตรวจสอบจึงใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7.9), 1x BSA, 1 U *Kpn*I, 1 U *Hind*III และดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 1 % (1 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล โดยหากพลาสมิดนั้นมีชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาอยู่แถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจะมีทั้งแถบของ pGL3-Basic Vector ขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส หรือ pGEM®-T Easy Vector ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายชนิด S และ L อัลลีล ของ 5-HTTLPR หรือขนาด 860 คู่เบส ซึ่งจะเป็นส่วนของ promoter ของยีน SERT ที่ขาดลักษณะของความหลากหลายชนิด 5-HTTLPR (*Eco*RI deletional mutant)

3.3.6 การสกัดพลาสมิด (Plasmid DNA) จากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมาก (Maxiprep)

หลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการแล้ว ขั้นตอนต่อไปต้องทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดเหล่านี้ ให้มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอที่จะทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ โดยใช้ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen) เป็นการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากเรียกว่า Maxiprep เริ่มจากเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียใน LB Broth ปริมาตร 200 ml นำมาปั่นที่ความเร็ว 4,000g นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย Resuspension Buffer (R3), Lysis Buffer (L7) และ Precipitation Buffer (N3) อย่างละปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสเติมลงใน Column ที่ทำการ equilibrated แล้ว ภายใน Column จะมี anion-exchange resin ซึ่งจะจับกับประจุลบของดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใส ขณะที่สารอื่นๆ จะถูกชะออกไปด้วย Wash Buffer 60 ml จากนั้นดีเอ็นเอที่อยู่ภายใน Column จะถูกชะออกมาพร้อมกับ Elution Buffer 15 ml แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วย 100 % Isopropanol ปริมาตร 10.5 ml โดยปั่นที่ความเร็วมากกว่า 15,000 *g* อุณหภูมิ 4 ^{o}C นาน 30 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 5 ml ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 200-500 µl ตามต้องการและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C

3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

เลี้ยงเซลล์ HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร.วีระ วงศ์คำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) เซลล์ HEp2 (Human Larynx carcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวากุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เซลล์ HeLa (Human Cervix carcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เซลล์ HaCaT (Human Keratinocyte cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.พญ.ดร.จงกลนี วงศ์ปิยะบวร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เซลล์ HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.พญ.ดร. ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เซลล์ Jurkat (Human T cell lymphoblast-like cell line) และเซลล์ SW480 (Human colon adenocarcinoma cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone) และเลี้ยงเซลล์ L6 (Rat skeletal muscle cell line) (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร.จันทิภา ปุรินทราภิบาล ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Hyclone) ที่ผสมกับ 10% Fetal Bovine Serum (Hyclone) และยาปฏิชีวนะซึ่งประกอบด้วย 100 U/100 µg/ml Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin B (Invitrogen) โดยนำเซลล์มา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่มีอุณหภูมิ 37 ^{o}C และความเข้มข้นของ CO_2 ประมาณ 5 %

3.5 การคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง

3.5.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยง

เริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการสกัดใน cell culture dish (ขนาด 100 mm X 20 mm) ล้างเซลล์ด้วย Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (JRH Biosciences) ที่เย็น แล้วรีบเติมน้ำยา TRIZOL® Reagent (Invitrogen) ปริมาตร 3 ml ลงไปในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้ใบมีดที่ทำความสะอาดด้วย RNase AWAY (Continental Lab Products) ขูดเซลล์ให้หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง ปิเปตต์สารละลายเซลล์ที่ได้ใส่หลอดและเติม chloroform ที่เย็นลงไป 200 µl ต่อปริมาตรน้ำยา TRIZOL® Reagent 1 ml เขย่าให้เข้ากันอย่างแรงแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2 ^{o}C

-8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 *g* นาน 15 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็นชั้น โดยชั้นล่างสุดของหลอดคือชั้นที่มีสีแดงซึ่งเป็นชั้นของ organic phase (phenol-chloroform phase) ถัดขึ้นมาเป็นชั้น interphase และบนสุดคือชั้นน้ำที่ไม่มีสีเป็นชั้นของ aqueous phase ซึ่งอาร์เอ็นเอจะอยู่ในชั้นนี้ จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสชั้นบนสุดมาทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 100 % Isopropanol ปริมาตร 500 µl ต่อปริมาตรน้ำยา TRIZOL® Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 *g* นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 1 ml ทั้งหมด 3 รอบ โดยปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 7,500 *g* นาน 5 นาที สุดท้ายตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase (DEPC-treated water) ที่อุณหภูมิ 55 °C -60 °C นาน 10 นาที ซึ่งสาร ละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

3.5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนต่างๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลอง ด้วยเทคนิค Reverse-Transcriptase (RT) PCR ซึ่งยีนที่ต้องการตรวจสอบมีดังนี้ ยีน Serotonin transporter (SERT), Estrogen receptor (ER), Glucocorticoid receptor (GR), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) receptor (bFGFR) และ Epidermal Growth Factor (EGF) receptor (EGFR) โดยใช้ยีน β-actin หรือ glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็นตัวควบคุม การทดลองครั้งนี้จะใช้ชุดน้ำยา SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) และใช้อาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ที่สกัดได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นต้นแบบ (template) ในการทำปฏิกิริยา เริ่มจากการ treat อาร์เอ็นเอด้วย Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen) เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนจากการสกัดโดยผสมอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1µg กับน้ำยา (1x DNase I Reaction buffer, 0.1 U/ml DNase I Amp Grade) แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ inactivate เอนไซม์ DNase I ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการ treat มาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 โดยผสมอาร์เอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 1 µg กับน้ำยาในการทำปฏิกิริยา RT-PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x Reaction Mix (0.4 mM dNTP mix, 3.2 mM $MgSO_4$), SuperScript™ III RT/Platinum *Taq*

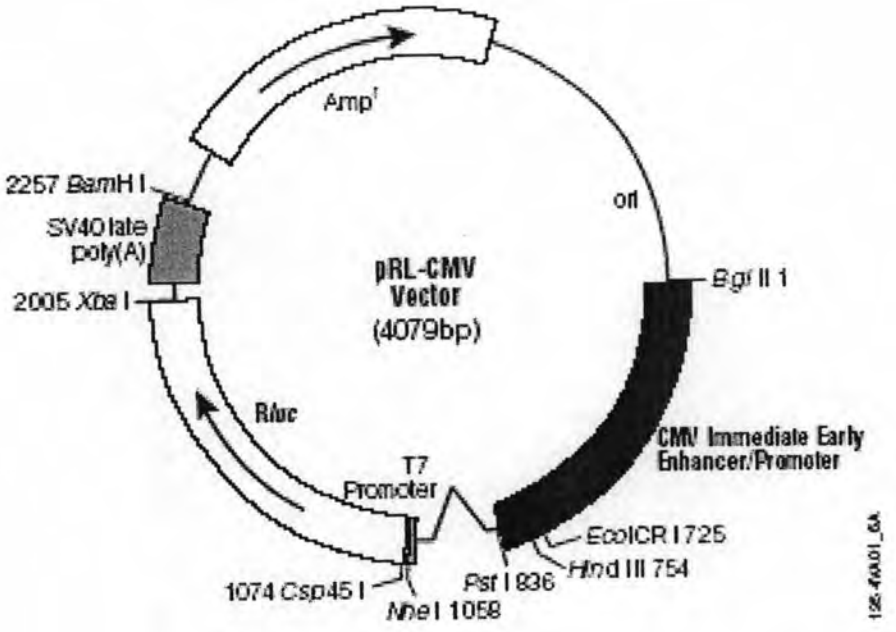
Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 45 °C -60 °C นาน 15-30 นาทีในขั้นตอนการสร้างสาย complementary DNA (cDNA) จากนั้นต่อด้วย 94.0 °C 2 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 30 วินาที; 55.0 °C -65.0 °C 30 วินาที; 68.0 °C 2 นาที (40 รอบ); 68.0 °C 10 นาที (1 รอบ) เสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 1 % (1 % agarose gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล เซลล์ที่เหมาะสมในการทดลองจะต้องเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน receptor ของสารที่จะทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดง primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ

Primer	Sequence	Product (bp)
hβ-actin Sense	5'-ACG GGT CAC CCA CAC TGT GC-3'	863
hβ-actin Anti-sense	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3'	
hERα Sense	5'-TAT GGG GTC TGG TCC TGT GA-3'	334
hERα Anti-sense	5'-GGG CGG GGC TAT TCT TCT TA-3'	
hERβ Sense	5'-TTC CCG GCA GCA CCA GTA ACC-3'	262
hERβ Anti-sense	5'-TCC CTC TTT GCG TTT GGA CTA-3'	
hGRα/β Sense	5'-CTT ACT GCT TCT CTC TTC AGT TCC T-3'	
hGRα Anti-sense	5'-GCA ATA GTT AAG GAG ATT TTC AAC C-3'	204
hGRβ Anti-sense	5'-AGT GCA CAT AAT CTT CTT TTT C TC A-3'	292
hGAPDH Sense	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'	226
hGAPDH Anti-sense	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	
hSERT Sense	5'-CAT CTG GAA AGG CGT CAA G-3'	319
hSERT Anti-sense	5'-CGA AAC GAA GCT CGT CAT G-3'	
hEGFR Sense	5'-GCT ACG ATT GGC TGA AGT AC-3'	518
hEGFR Ant-sense	5'-ATT GGG TGT AGA GAG ACT GGA-3'	
hFGFR1 Sense	5'-CAT CAT CTA TTG CAC AGG GG-3'	442
hFGFR1 Anti-sense	5'-AGT CTT TCT CTG TTG CGT CCG-3'	
hFGFR2 Sense	5'-CTC AAC CAG AAG TGT ACG TG-3'	470
hFGFR2 Anti-sense	5'-GCT CCT GCT TAA ACT CCT TC-3'	

3.6 การถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Transfection)

นำดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้ทั้ง 3 แบบ ซึ่งจะมีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอที่จะทำการทดลอง มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เหมาะสมที่ผ่านการคัดเลือกแล้วด้วยชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบ (เซลล์ SW480 จำนวน 40,000 เซลล์ต่อหลุมและเซลล์ HT-29 จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุม) ใน 96 well cell culture plate และนำมา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ปริมาณเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 90-95 % ในวันต่อไปที่จะทำการทดลอง ก่อนการถ่ายโอนดีเอ็นเอให้ล้างเซลล์ที่จะทดสอบ 2 รอบด้วยอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัม (serum) กับยาปฏิชีวนะผสมอยู่และจึงเติมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะนั้นลงไปหลุมละปริมาตร 100 µl จากนั้นเติมส่วนผสม (complexes) ของดีเอ็นเอพลาสมิดที่จะทำการถ่ายโอนให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายเท่ากับ 0.2 µg และพลาสมิดร่วม (Co-transfected pRL-CMV Vector) ดังแสดงลักษณะของพลาสมิดในรูปที่ 3.4 (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Robert K. Yu, Virgenia Commmonwealth University, Richmond, Virgenia) 0.02 µg ต่อหลุม กับน้ำยา Lipofectamine™ 2000 ปริมาตร 0.5 µl ต่อหลุม โดยเจือจางในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้อาจเห็นสารละลายเป็นสีขุ่นได้ และสามารถเก็บส่วนผสมนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 6 ชั่วโมง ขั้นต่อมาปิเปตต์ส่วนผสมที่เตรียมปริมาตร 50 µl ต่อหลุม ผสมให้เข้ากันโดยการเคาะ plate เบาๆ จากด้านข้าง แล้วนำมา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันต่อมาจึงทำการเปลี่ยนเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมอยู่ และอาจผสมสารต่างๆ ได้แก่ dexamethasone water soluble (Sigma) หรือ β-estradiol water soluble (Sigma) ที่จะทดสอบกับเซลล์ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมอยู่นี้ให้มีความเข้มข้นตามต้องการได้ ซึ่งการทดลองนี้จะใช้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 10^{-3}, 10^{-6} และ 10^{-9} nM (21, 281) เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมงก่อนที่จะทดสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter ในวันต่อไป



รูปที่ 3.4 แสดงลักษณะของ Co-transfected pRL-CMV Vector (http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1354va&partno=E2261&product=pRL%2DCMV+Vector)

3.7 การทดสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter ด้วยเทคนิค Reporter Gene Assay

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter เพื่อศึกษา promoter activity ของยีน SERT จะทำการวัดโดยใช้ชุดน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) ซึ่งจะวัดทั้งปริมาณของ firefly luciferase จาก luciferase reporter gene constructs (pGL3-Basic Vector) ที่สร้างขึ้นกับปริมาณของ *Renilla* luciferase จาก pRL-CMV Vector ซึ่งเป็นตัวควบคุม (control reporter) ที่จะถูกถ่ายโอนร่วมกับดีเอ็นเอพลาสมิดที่ต้องการทดสอบ (co-transfected) เข้าไปด้วยพร้อมกัน เพื่อลดปัญหาผลกระทบจากจำนวนของเซลล์ที่ใช้ (cell number) และประสิทธิภาพในการ transfection (transfection efficiency) รวมถึงผลที่ไม่จำเพาะต่างๆ (global effects) เป็นต้น โดยนำเซลล์ที่จะตรวจวัดออกมาเติมน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Reagent (Dual-Glo™ Luciferase Buffer, Dual-Glo™ Luciferase Substrate) ปริมาตร 100 µl ต่อหลุมของ 96 well cell culture plate ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดปริมาณของ firefly luciferase จากนั้นเติมน้ำยา Dual-Glo™ Stop&Glo Reagent (Dual-Glo™

Stop&Glo Buffer, Dual-Glo™ Stop&Glo Substrate) อีก 100 µl ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดปริมาณของ *Renilla* luciferase ซึ่งค่าของปริมาณแสง luminescence ที่ได้ทั้งสองจะถูกวัดด้วยเครื่อง VICTOR^3 (PerkinElmer)

3.8 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้คือ activities ของ firefly luciferase กับ *Renilla* luciferase ซึ่งจะถูกนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนของ firefly luciferase activities ต่อ *Renilla* luciferase activities ในแต่ละการทดลอง แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับอัตราส่วนที่มาจากการถูก transfect ด้วย negative control คือ pGL3-Basic plasmid ที่ไม่ถูกเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ค่าที่ได้นั้นจะถูกคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) เพื่อนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างค่าที่ได้จากเซลล์ ซึ่งถูกถ่ายโอนด้วยพลาสมิดที่มีส่วน 5-HTTLPR ชนิดอัลลีล L ชนิดอัลลีล S และพลาสมิดที่ขาดตรงส่วนของ 5-HTTLPR (L860) ไป จะแสดงถึง promoter activity ของยีน SERT ที่มีความหลากหลายของยีนชนิด 5-HTTLPR ในแบบต่างๆ นอกจากนี้ยังดูถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเติมสารชนิดต่างๆ ได้แก่ dexamethasone water soluble (Sigma) หรือ β-estradiol water soluble (Sigma) ลงไปในปริมาณที่ต่างกัน (10^{-3}, 10^{-6} และ 10^{-9} nM) รวมถึงการตรวจสอบความจำเพาะต่อเซลล์ ก็จะถูกวัดโดยการเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างเซลล์แต่ละชนิด (เซลล์ SW480 และ เซลล์ HT-29) ด้วย แต่ละการทดลองจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง (tripicate) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้การคำนวณสถิติ t-test ($p<0.05$) ในการตัดสินใจว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่อย่างไร