บทที่ 3
วิธีวิจัย

3.1 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

ในการตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์นั้นจะนำเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มาทำการทดลองโดยใช้เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ (normal karyotyped amnocytes) เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ และเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ (aneuploidy amniocytes) เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ เพื่อนำมาเปรียบเทียบความหลากหลายของชนิดของเซลล์ที่อาจมีความแตกต่างกัน

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำทั้งสองชนิดใช้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเป็นกลุ่มควบคุมสำหรับเปรียบเทียบคุณสมบัติความเป็นเซลล์มะเร็ง และใช้เซลล์น้ำคร่ำปกติ เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับเปรียบเทียบความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่พบในเซลล์น้ำคร่ำ

3.1.1 เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์ (human amniocytes cell lines)

เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์สองเชื้อสาย AMC-K46 และ AC-F2 เป็นเซลล์ที่ได้พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเซลล์มนุษย์และสัตว์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เซลล์ทั้งสองเชื้อสายนี้เกิดจากกระบวนการกลายพันธุ์แบบเกิดขึ้นเองเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลานาน (Dasa, 2005) การเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ ใช้ขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 cm^2 และอาหารเลี้ยงเซลล์ (media) ชนิด Dulbecco's Modification Eagle's MEM (DMEM) ผสมกับ fetal bovine serum (FBS) 10% โดยเพาะเลี้ยงไว้ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37^{o}C ความชื้น 95% และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3.1.2 เซลล์เชื้อสายมะเร็ง (cancer cell lines)

ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์เชื้อสายมะเร็ง 2 ชนิด มะเร็งผิวหนัง C32 (amelanotic melanomas cell lines) และมะเร็งฟาริงค์ Hep2 (pharynx carcinomas cell lines) สำหรับการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์นั้น ใช้วิธีการเดียวกับเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์ AMC-K46 และ AC-F2 ดังที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.1.1

3.1.3 เซลล์น้ำคร่ำของมนุษย์ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม (normal human amniocytes)

เซลล์น้ำคร่ำปกติของมนุษย์ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยนี้เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม โดยได้รับตัวอย่างเซลล์มาจาก ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์มนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตัวอย่างเซลล์ทั้งหมดที่ได้รับมี 6 ตัวอย่างแบ่งเป็น เซลล์น้ำคร่ำที่มีโครโมโซมปกติ(2n = 46) จำนวน 3 ตัวอย่าง และเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ (มีจำนวนโครโมโซมแบบ trisomy 21) จำนวน 3 ตัวอย่าง ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) FBS 10% และ AmnioMAX® จากนั้นเพาะเลี้ยงไว้ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีอุณหภูมิ 37 ^{o}C ความชื้น 95% และปริมาณ CO_2 เท่ากับ 5%

3.2 Immunocytochemistry

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ AMC-K46, AC-F2 เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 และเซลล์น้ำคร่ำมนุษย์ทั้งแบบที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและแบบที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ โดยเซลล์ทั้งหมดจะถูกนำไปย้อมด้วยแอนติบอดีหรือ protein marker ที่จำเพาะเพื่อตรวจสอบอัตราการแสดงออกของแอนติเจนที่สนใจ ซึ่ง protein marker ที่นำมาทดสอบนั้นแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ germ layer marker ที่ใช้ตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์ ได้แก่ cytokeratin AE1&AE3, vimentin และ AFP ส่วนกลุ่มที่สองคือ proliferation marker ที่ใช้ตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ ได้แก่ cyclin D1 และ Ki-67 โดยทำการเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 กับเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 และใช้เซลล์น้ำคร่ำปกติเป็นกลุ่มควบคุมสำหรับเซลล์ปกติ

3.2.1 การเตรียมเซลล์ในลักษณะแขวนลอย (cell suspension)

เนื่องจากเซลล์เชื้อสายที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเซลล์เกาะทั้งหมด (adherent cells) จึงใช้เทคนิค เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดเลี้ยง (trypsinization) ซึ่งมีกระบวนการดังต่อไปนี้

1. เริ่มทำโดยดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) เพื่อไม่ให้มีอาหารเลี้ยงเซลล์เคลือบอยู่ เพราะโปรตีนจากน้ำยาเลี้ยงเซลล์จะรบกวนการทำงานของสารละลาย trypsin/EDTA
2. เติมสารละลาย trypsin/EDTA ปริมาตร 1.5 ml ลงในขวดเพาะเลี้ยง จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จึงดูดออกทิ้งให้หมดนำขวดเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บ่มไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่างว่าเซลล์หลุดออกจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์หรือไม่
3. เมื่อเซลล์หลุดหมด (มากกว่าร้อยละ 80) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 2.5 ml แล้วใช้ Pasteur pipette ดูดพ่นเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดและกระจายออกจากกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ดูดสารละลายเซลล์ออกมาเพียงบางส่วนเพื่อทำการนับโดยใช้ hemocytometer และคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ (ภาคผนวก ค)
5. ปรับปริมาตรของเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100,000-500,000 cell/ml ปริมาตร 2-5 ml ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml

3.2.2 การเตรียมสไลด์และเทคนิค cytospin

หลังจากกระบวนการ trypsinization และปรับจำนวนเซลล์ได้ตามที่ต้องการแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1200 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้งไป เหลือเพียงตะกอนเซลล์ด้านล่างก้นหลอด นำตะกอนเซลล์ไปปั่นด้วยความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 3 นาทีด้วยเครื่อง cytospin จะได้กลุ่มเซลล์ที่เกาะอยู่บนสไลด์ เรียกว่า cytospin slide ส่วนในการตรึงเซลล์ (fix) นั้น จะจุ่ม cytospin slide ใน แอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 20 นาที

3.2.3 การย้อมด้วยแอนติบอดี

หลังจากเตรียม cytospin slide แล้ว จึงนำไปย้อมด้วยแอนติบอดีที่ต้องการศึกษา (กล่าวไว้ในข้อ 3.2) ด้วยวิธี two-step staining จากชุดทดลองของ DakoCytomation Envision+, System-HRP Labelled Polymer kit (DakoCytomation, USA) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. ล้างสไลด์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้งเพื่อล้างสิ่งเจือปนออกไป จากนั้นจึงเติม endogenous reagent ลงไป แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 1 นาที จึงล้างออกด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง
2. หยด primary antibody ที่ต้องการศึกษาลงบนสไลด์ แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยให้ครอบคลุมพื้นที่ของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้นล้างออกด้วย PBS 2 ครั้ง (ไม่ควรล้างให้โดนบริเวณตัวอย่างโดยตรง) จากนั้นจึงนำไปแช่ใน buffer
3. หยด polymer-HRP anti-mouse (EnVision) ลงบนตัวอย่าง แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงล้างออกด้วย PBS 2 ครั้ง ควรล้างออกให้หมดเพื่อป้องกันการเกิด false positive
4. เติม 3, 3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB staining) ลงบนสไลด์ แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 10 นาที จึงล้างออกเบาๆ ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที
5. จุ่มสไลด์ลงในอ่างย้อมที่บรรจุ hematoxylin เป็นเวลา 15-20 นาที (ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ hematoxylin ที่ใช้) จากนั้นจึงล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น
6. จุ่มสไลด์ลงในอ่างที่บรรจุสารละลายแอมโมเนีย ความเข้มข้น 0.037 mol/L จำนวน 10 ครั้ง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่ไหลผ่านเป็นเวลา 2-5 นาที
7. ผึ่งสไลด์ให้แห้ง จากนั้นจึงหยด permount และปิดด้วย cover slip เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลการย้อม โดยเซลล์ที่มีการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดี หรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ผลเป็นบวก เซลล์จะมีสีน้ำตาล ส่วนเซลล์ที่ให้ผลเป็นลบจะติดสีน้ำเงินของ hematoxylin

3.3 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

3.3.1 การเตรียมเซลล์เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์ที่กล่าวทั้งหมดในข้อ 3.1 มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอจะต้องใช้เซลล์อย่างน้อยจำนวน 2×10^6 เซลล์ขึ้นไปและทำการสกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ขั้นตอนในการสกัดอาร์เอ็นเอมีดังนี้

1. เพาะเลี้ยงเซลล์จนได้เซลล์ที่เจริญอยู่ในระยะ mid log จากนั้นทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวขวดเพาะเลี้ยง
2. ดูดสารละลายเซลล์ทั้งหมดลงใน centrifuge tube ขนาด 15 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,100-1,200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
3. ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไป แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 5 ml จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,100-1,200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
4. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 อีก 1 ครั้ง
5. ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไป แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 1 ml เพื่อล้างตะกอนเซลล์ แล้วดูดสารละลายทั้งหมดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
6. นำไปปั่นตกตะกอนในเครื่อง thermo-centrifuge ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที
7. ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไป แล้วจึงเติม Trizol® reagent ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette จากนั้นจึงนำไปสกัดอาร์เอ็นเอหรือเก็บไว้ที่ -20 ^{o}C

3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

อาร์เอ็นเอมีคุณสมบัติที่ไวต่อการถูกทำลายเนื่องจากมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลไรโบสสายเดี่ยว ดังนั้นกระบวนการในการสกัดอาร์เอ็นเอจึงควรทำที่อุณหภูมิต่ำหรือประมาณ 4 ^{o}C

1. นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 มาเติมด้วย Trizol® reagent ปริมาตร 200 µl แล้วดูดเป่าให้สารละลายเข้ากัน
2. ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ จากนั้นจึงเติม chloroform ปริมาตร 200 µl แล้ว vortex เป็นเวลา 10 วินาที หรือจนกระทั่งสารละลายผสมกันดี จากนั้นจึงแช่ไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที
3. นำไปปั่นตกตะกอนในเครื่อง thermo-centrifuge ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ค่อยๆ ดูดสารละลายด้านบนออกมาใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่เติม isopropanol ปริมาตร 500 µl ไว้ก่อนแล้ว จากนั้นจึงผสมให้เข้ากันด้วยการเอียงหลอดเบาๆ ไปมาประมาณ 5-10 ครั้ง ตั้งหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
5. นำไปปั่นตกตะกอนในเครื่อง thermo-centrifuge ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 8 นาที
6. ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไป แล้วจึงเติม 95% ice-cold ethanol ปริมาตร 1,000 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette
7. นำไปปั่นตกตะกอนในเครื่อง thermo-centrifuge ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที
8. เทสารละลายด้านบนทิ้งไปแล้วปล่อยตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
9. เติม DEPC water ปริมาตร 10 µl ลงไปเพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ
10. เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอจึงเติม RNase inhibitor ปริมาตร 1 µl, DNase I ปริมาตร 2 µl, 10X DNase I buffer ปริมาตร 5 µl, 100 mM DTT ปริมาตร 1 µl และเติม DEPC water ลงไปโดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 µl จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที
11. ทำซ้ำอีกครั้ง โดยเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 จนถึงขั้นตอนที่ 8 และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC water ปริมาตร 10 µl
12. เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C
13. ตรวจสอบอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer โดยใช้กำลังไฟ 75 watt เป็นเวลา 45 นาที
14. ย้อมเจลด้วย 0.5% (v/v) ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 10 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบและถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV-transilluminator โดยใช้โปรแกรม Quantity One V. 4.4.1

3.3.3 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์เชื้อสายจะทำให้กลายเป็นซีดีเอ็นเอสายคู่โดยใช้เอนไซม์ M-MuLV® Revertid reverse transcriptase (Vivantis) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม PCR tube ใหม่ไว้ 2 หลอด โดยในหลอดแรกเติมสารดังต่อไปนี้
   - oligo dT_{12} (500 µg/ml) ปริมาตร 1 µl
   - 10 mM dNTP ปริมาตร 1 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- DEPC water ปริมาตร 2 µl (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของอาร์เอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา)
- อาร์เอ็นเอต้นแบบปริมาตร 8 µl

ผสมสารทั้งหมดในหลอดให้เข้ากันจากนั้นจึงบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1-2 นาที

2. เตรียม PCR tube ใหม่ หลอดที่สอง โดยเติมสารดังต่อไปนี้
   - 5X MuLV buffer (Vivantis) ปริมาตร 4 µl
   - Ribolock® ปริมาตร 1 µl
   - 100 mM DTT ปริมาตร 2 µl
   - M-MuLV® Revertid reverse transcriptase enzyme ปริมาตร 1 µl
3. ผสมสารละลายจาก PCR tube หลอดที่ 1 ลงใน PCR tube หลอดที่ 2 (ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl) จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาทีและ 42 ^{o}C เป็นเวลา 90 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที
4. เก็บตัวอย่างซีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการศึกษาต่อไป

3.3.4 การตรวจสอบปริมาณซีดีเอ็นเอ

เจือจางสารละลายซีดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณ โดยผสมน้ำกลั่นปริมาตร 995 µl กับสารละลายซีดีเอ็นเอปริมาตร 5 µl ใน microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความบริสุทธิ์ของซีดีเอ็นเอ ($OD_{260/280}$) และค่าความเข้มข้นของซีดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ค) เพื่อใช้ในการปรับปริมาณ ซีดีเอ็นเอให้เท่ากับ 50 ng/µl ก่อนนำไปศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

หลังจากได้สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอของเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46, AC-F2 เซลล์เชื้อสายมะเร็ง C32, Hep2 และเซลล์น้ำคร่ำมนุษย์อีก 3 ตัวอย่างแล้ว จึงนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน 2 กลุ่ม คือ (1) stem cell related genes ได้แก่ integrin alpha 6 (*ITGA6*) และ integrin bata1 (*ITGB1*) (2) Cancer related genes ได้แก่ homo sapiens v-ski sarcoma viral oncogene homolog

(*SKI*), transforming growth factor beta 1 *(TGF-β1)* และ human telomerase reverse transcriptase *(hTERT)* โดยยีนที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมคือ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase *(GAPDH)*

3.4.1 Semi-quantitative reverse transcriptase PCR

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในเบื้องต้นนั้น จะใช้เทคนิคนี้เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนอย่างคร่าวๆ โดยเปรียบเทียบจากค่าความเข้มของแถบสว่างที่ปรากฏเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis ในขั้นตอนการทำ PCR จะต้องผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

- ซีดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบ 100 ng
- forward และ reverse primer (10 mM)
- 10 mM dNTP
- *Taq* polymerase ความเข้มข้น 0.5 U ใน 1X PCR buffer
- 3.0 mM $MgCl_2$

จากนั้นเริ่มปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Thermal cycler (My Cycler, BIORAD) โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเริ่มปฏิกิริยาดังตาราง 3.1 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา จึงนำ PCR product ไปตรวจสอบด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer แล้วย้อมเจลด้วย 0.5% (v/v) ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปส่องใต้แสง UV ในเครื่อง UV-transilluminator (BIORAD) และวัดค่าความสว่างของ PCR product หรือเรียกว่าค่า volume (INT*mm^2) โดยใช้โปรแกรม Quantity One V. 4.4.1 จากนั้นจึงนำค่า volume มาคำนวณหาระดับการแสดงออกของยีน(ภาคผนวก ค) แล้วนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 14.0 (ภาคผนวก จ)

3.4.2 Real-time PCR

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ชุดทดลอง Quantitect® SYBR® Green PCR (Qiagen) เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี real-time PCR โดยเซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเซลล์เดียวกันกับการศึกษาด้วยวิธี semi-quantitative reverse tanscriptase PCR ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. ผสมสารละลาย (2X QuantiTect® master mix) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (ตาราง 3.3) ลงใน 8-strip PCR tube ชนิด 8 หลอดต่อ 1 แถว โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 µl
2. ตั้งอุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยา real-time PCR จากเครื่อง MJ Research DNA Engine Opticon®2 (BIORAD) (ตาราง 3.4) โดยใช้โปรแกรม Optical Monitor™ 2 สำหรับควบคุมและเก็บข้อมูลการทำปฏิกิริยา
3. นำตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วใส่ในลงเครื่อง จากนั้นจึงเริ่มปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เครื่อง real-time PCR จะแสดงผลการทดลองในรูปแบบของกราฟและค่า C_T ของแต่ละยีน จากนั้นจึงนำค่า C_T ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อคำนวณหาสัมประสิทธิ์ระดับการแสดงออกของยีน (relative expression) (ภาคผนวก ค)

ตาราง 3.1 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา
- ขั้นตอนที่ 1	94	5 นาที
- ขั้นตอนที่ 2 (40 รอบ)		
Denaturation	95	30 วินาที
Annealing	อุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์แต่ละคู่ (ตาราง 3.2)	30 วินาที
Extension	72	30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 3	72	10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละคู่และอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing

ยีน	accession number	ลำดับเบสของ primer (5'→ 3')	อุณหภูมิ annealing (^{o}C)
GAPDH	NM_002046	Fw-GGCAAATTCCATGGCACCGTC	51
		Rw-CAATGCCAGCCCCAGCGTC	
ITGA6	AF166335	Fw-ACAACGGGCTCATTCAGCGGTC	62
		Rw-CGAGTGTCCAAGTTGAAGGCTGC	
ITGB1	BC020057	Fw-CTCAAGCCAGAGGATATTAC	60
		Rw-TGCACAAGTGAACAGAACTG	
SKI	AH013090	Fw-AGCGTAACCTGCGGAAGGAG	64
		Rw-GAAGGTGGTGAAGGAGCTGC	
TGF-β1	NM_000660	Fw-TGCTAATGGTGGAAACCCAC	64
		Rw-TACAGCAACAATTCCTGGCG	
hTERT	AF128893	Fw-CGTGGTTTCTGTGTGGTGTC	53
		Rw-CCTTGTCGCCTGAGGAGTAG	

ตาราง 3.3 สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

สารละลาย	ความเข้มข้นที่ใช้ในปฏิกิริยา
2X QuantiTect® master mix	1X
forward primer	0.3 µM
reverse primer	0.3 µM
cDNA template	100 ng

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.4 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา	หมายเหตุ
- ขั้นตอนที่ 1	95	15 นาที	
- ขั้นตอนที่ 2 (45 รอบ)			
Denature	94	15 วินาที	
Annealing	50-60	30 วินาที	เป็นขั้นตอนที่เก็บข้อมูลจาก real-time PCR product
Extension	72	30 วินาที	

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.5.1 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนจากการศึกษาด้วยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase PCR

การวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนจากการศึกษาด้วยวิธีนี้ ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS v 14.0 โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Complete Randomized Design (CRD) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย volume ของแต่ละยีนด้วยวิธี one – way analysis of variance (ANOVA) และ multiple pairwise comparison แบบ t-test ตามวิธีของ Dunnett t จากนั้นจึงจัดกลุ่มข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ยตามวิธีการของ Dancan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ $p \leq 0.05$ โดยผลจากการวิเคราะห์จะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์แต่ละชนิด ซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวก จ

3.5.2 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนจากการศึกษาด้วยวิธี real-time PCR

การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าของสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน (relative expression) จะใช้การวิเคราะห์แบบเดียวกันกับการศึกษาด้วยวิธีแรกโดยผลจากการวิเคราะห์จะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์แต่ละชนิด ซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวก จ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved