

บทที่ 3

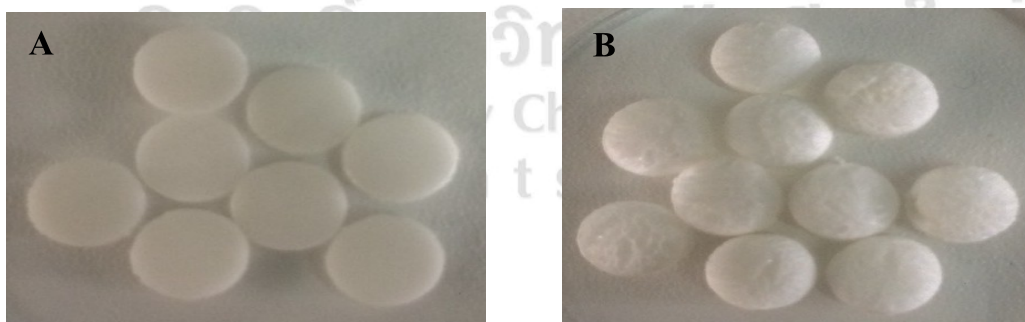
วัสดุและวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

รายละเอียดของอุปกรณ์และสารเคมีได้รวบรวมไว้ในภาคผนวก ก

3.2 วัสดุสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ PCL ผสมกับ HA (PCL/HA) ที่ได้รับมาจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จ.ปทุมธานี ประเทศไทย (MTECH) เป็นวัสดุชีวภาพที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยพลาสมาของก๊าซออกซิเจน (O_2 plasma) กระบวนการขึ้นรูปวัสดุได้ผ่านการควบคุมให้เป็นไปตามมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบทางชีวภาพรหัสของวัสดุคือ MTEC-CMU-P/HA/022556 โดยในการทดลองนี้ใช้วัสดุทั้งสิ้น 4 แบบ คือ (1) แผ่นฟิล์มที่ไม่อบพลาสมา (F) (2) แผ่นฟิล์มที่อบพลาสมา (PT-F) (3) โครงร่างสามมิติที่ไม่อบพลาสมา (S) และ โครงร่างสามมิติที่อบพลาสมา (PT-S) วัสดุที่เป็นแผ่นฟิล์มจะมีลักษณะเป็นแผ่นหนา ยืดหยุ่น มีสีขาว และทึบแสง (ภาพที่ 3.1A) ส่วนวัสดุที่เป็นโครงร่างสามมิติจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมหนา มีรูพรุน สามารถซับน้ำได้ดี (ภาพที่ 3.1B) โดยวัสดุทั้ง 4 ชนิดนี้ ได้ถูกตัดให้เป็นรูปวงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 mm ซึ่งเป็นขนาดที่พอดีกับขนาดของหลุมในจานเลี้ยง 96-well plate ส่วนวัสดุควบคุมที่ใช้ในการทดลองนี้คือ commercial PS



ภาพที่ 3.1 วัสดุ polycaprolactone (PCL/HA) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 mm (A) ที่ขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม และ (B) ที่ขึ้นรูปเป็น 3 มิติ (โครงร่าง)

3.3 การเตรียมวัสดุ PCL/HA เพื่อนำไปทดสอบกับเซลล์

- 1) นำวัสดุ PCL/HA ทั้ง 4 ชนิด และ PS ไปฆ่าเชื้อ (sterilization) ด้วยการนำไปอบรังสี UV เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วใช้ forceps คีบวัสดุพลิกกลับอีกด้านหนึ่ง เพื่ออบ UV ต่ออีก 30 นาที

หมายเหตุ : วัสดุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสามารถเก็บไว้ในภาชนะปลอดเชื้อได้แต่หากต้องการนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ทำตามขั้นตอนต่อไป

- 2) ใช้ forceps คีบวัสดุแต่ละชนิดวางลงในหลุมของจานเลี้ยง 96 well plate จากนั้นเติม phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 200 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วดูดออก
- 3) เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ (media) ปริมาตร 100 μ l ลงในแต่ละหลุม ใช้ forceps กดวัสดุเบาๆ เพื่อให้วัสดุอมน้ำและจมอยู่ใน media (เฉพาะในกรณีที่วัสดุลอยขึ้นมา) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้อบ CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงดูด media ออกก่อนนำไป เพาะเลี้ยงเซลล์

หมายเหตุ : ขั้นตอนที่ 2) และ 3) ต้องทำในตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ

3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด BCP-K1

นำเซลล์ต้น BCP-K1 ที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C จากธนาคารเซลล์ ออกมาละลาย โดยเลือกเซลล์ที่มีจำนวน passage ต่ำที่สุดมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² โดยใช้อาหารเลี้ยงชนิด Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification (α -MEM) (Gibco, USA) กับ fetal bovine serum (FBS) 20% (v/v) และ 1x antibiotic-antimycotic (Gibco, USA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, ความชื้นสัมพัทธ์ 95% ใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ 5% (v/v) ซึ่งเป็นสภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ตลอดการทดลองนี้ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้อง inverted microscope ตรวจสอบการเจริญของเซลล์และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญจนเกือบเต็มพื้นที่ขวดเลี้ยง (subconfluent) หรือประมาณ 80% ของพื้นผิว) จึงทำการเพาะเลี้ยงแยก (subculture) ด้วย 0.1% (v/v) trypsin-EDTA (ภาคผนวก) เพื่อนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อหรือทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.5 การตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ PCL/HA ต่อเซลล์ BCP-K1

ในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่

3.5.1 การประเมินศักยภาพในการลงเกาะของเซลล์ด้วยเทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

สารละลายที่ใช้ในเทคนิค ELISA และการเตรียมอยู่ในภาคผนวก (ภาคผนวก ก)

1. นำเซลล์ BCP-K1 ที่เลี้ยงในขวดเลี้ยง 75 cm² มาดูดอาหารเลี้ยง เซลล์ออกแล้วทำการ trypsinization (ดูภาคผนวก ก)
2. นำเซลล์ในสภาพแขวนลอยมานับจำนวน โดยใช้ haemocytometer และปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ความหนาแน่นเท่ากับ 30,000 cells/ml (ดูภาคผนวก)
3. ดูดเซลล์ปริมาตร 100 µl ใส่ลงในจานหลุม 96-well plate ทั้งหมด 9 จาน โดยแต่ละจานจะมีวัสดุสังเคราะห์ทั้งสี่ชนิด แต่ละชนิดมีจำนวนซ้ำเท่ากับ 5 หลุม และกลุ่มควบคุม PS อีก 5 หลุม นำจานเลี้ยงทั้งหมดไปบ่มไว้ภายใต้สภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำจานเลี้ยงไปตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วย เทคนิค ELISA โดยทำการตรวจสอบในทุกวันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน ของการเลี้ยงเซลล์
5. เมื่อเลี้ยงเซลล์จนครบเวลาที่กำหนด นำจานเลี้ยงเซลล์นั้น มาดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป แล้วเติม fixing buffer ปริมาตร 100 µl ลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดออก
6. ล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย wash buffer ปริมาตรหลุมละ 200 µl จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วดูดออก
7. เติม quenching buffer ลงไปหลุมละ 100 µl (หรือใส่ลงไปพอให้ท่วมเซลล์) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดออก
8. ล้างด้วย wash buffer หลุมละ 200 µl จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
9. เติม primary (1°Ab) blocking buffer ปริมาตรหลุมละ 100 µl เพื่อป้องกันมิให้โปรตีนตัวอื่นทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จะใส่ลงไป หลังจากนั้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดูดออก
10. ล้างด้วย wash buffer หลุมละ 200 µl จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

11. เติม anti-FAK primary antibody ที่เจือจางลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 μ l นำจานเลี้ยงไปใส่ในกล่องควบคุมความชื้น (moist chamber) แล้วบ่มค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 °C
12. ดูด 1°Ab ออก แล้วล้างด้วย wash buffer หลุมละ 200 μ l จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
13. เติม secondary antibody (2°Ab) ที่เจือจางลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วดูดออก
14. ล้างด้วย wash buffer หลุมละ 200 μ l จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
15. เติมสารสับสเตรท (OPD) ที่เตรียมใหม่ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด เพื่อป้องกันมิให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับแสง ซึ่งอาจทำให้ค่าที่วัดได้มีความคลาดเคลื่อน
16. เมื่อครบเวลาแล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 492 nm (OD_{492}) ด้วยเครื่อง Rayto RT – 2100C microplate reader (Rayto, China)
17. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาระดับการแสดงออกของโปรตีนสัมพันธ์เปรียบเทียบกับวัสดุ PS จากการเพาะเลี้ยงวันที่ 1

3.5.2 การเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาในการลงเกาะของเซลล์

การเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ลงเกาะโดยใช้ SEM จะช่วยให้สามารถติดตามการลงเกาะของเซลล์ในช่วงเวลาต่าง ๆ ได้ รายละเอียดของการทดลองมีดังนี้

1. เตรียมเซลล์ตามข้อ 3.4.1 ข้อย่อย 1-2
2. เพาะเลี้ยงเซลล์ลงในจานเลี้ยง 96 well plate ที่มีวัสดุทั้ง 4 ชนิด วางอยู่ในหลุม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมาตรฐานก่อนนำไปตรวจสอบสัณฐานวิทยาด้วย SEM โดยจะทำการตรวจสอบภายหลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 72 และ 120 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ แผ่นกระจกสไลด์ (cover glass)
3. เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึงเวลาที่กำหนดให้นำวัสดุแต่ละชนิดที่มีเซลล์เกาะอยู่ มาตรึงสภาพด้วย 4% (v/v) paraformaldehyde บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วดูดออก
4. ล้างวัสดุในน้ำกลั่น 3-5 รอบ รอบละ 10 นาที

5. เดิมเอทานอลลงไปให้ท่วมวัสดุโดยเริ่มที่ความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูง (25, 50, 75, 95 และ 100% (v/v)) โดยใช้ความเข้มข้นละ 10 นาที ตามลำดับ แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ระวังอย่าให้โดนฝุ่น
6. นำแผ่นวัสดุที่หั่นด้านที่มีเซลล์เกาะขึ้นด้านบนไปติดบนแท่นวาง (stub) ด้วยเทปคาร์บอน ก่อนนำไปเคลือบด้วยอนุภาคทองคำ ตามวิธีการมาตรฐานในการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วย SEM (Jeol-5910 LV, 15 kv) แล้วบันทึกภาพเซลล์
7. นำภาพที่ได้มาวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เลี้ยงบนวัสดุแต่ละชนิด ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับ cover glass

3.5.3 การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์

ใช้วิธี ELISA เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3.4.1 แต่ใช้ชนิดของ antibody ที่ต่างกัน โดยในการทดลองนี้ จะใช้ 1°Ab ของ anti-cyclin A, mouse monoclonal antibody คู่กับ HRP-rabbit anti mouse 2°Ab เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน cyclin A แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาระดับการแสดงออกของโปรตีนสัมพันธ์เปรียบเทียบกับวัสดุ PS จากการเพาะเลี้ยงวันที่ 1

3.5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทั่วไปของเซลล์บนวัสดุทั้ง 4 ชนิด โดยการสกัด RNA จากเซลล์ที่เลี้ยงบนวัสดุเป็นเวลา 21 วัน แล้วเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้เทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน (รายชื่อยีนที่ศึกษาดูตาราง 3.1) โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1) การเตรียมเซลล์เพื่อสกัด RNA

การสกัด RNA จะต้องใช้เซลล์อย่างน้อยจำนวน 2×10^6 เซลล์ขึ้นไป โดยมีขั้นตอนการเลี้ยงและสกัด ดังนี้

1. นำเซลล์ BCP-K1 ที่เลี้ยงในขวดเลี้ยง 25 cm^2 มาดูค่าอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วทำการ trypsinization (ภาคผนวก ค ข้อ 2)
2. นำเซลล์ในสภาพลอยที่ได้มานับจำนวนโดยใช้ haemocytometer (ภาคผนวก ค ข้อ 4) และปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ความหนาแน่น เท่ากับ $1.6 \times 10^7 \text{ cells/ml}$

3. นำเซลล์ที่อยู่ในสภาพลอยใส่ลงในจานหลุม 96-well plate ที่มีวัสดุสังเคราะห์ทั้งสี่ชนิด โดยแต่ละชนิดเลี้ยงอย่างละ 4 หลุม เพื่อนำไปสกัด RNA ณ วันที่ 21 โดยใส่เซลล์ปริมาณ 100 μ l ลงในแต่ละหลุม
4. นำจานหลุม 96 well plate ที่เตรียมได้ไปบ่มในตู้บ่ม CO₂ ในสภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยงเซลล์
5. เมื่อเลี้ยงเซลล์จนครบ 21 วัน นำเซลล์ที่เลี้ยงในจานหลุม มาดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป แล้วล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย PBS ปริมาตร 100 μ l
6. กีบวัสดุ PCL ทั้งสี่ชนิดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่เติม Trizol® reagent ปริมาตร 500 μ l ไว้ก่อนแล้ว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นจึงนำไปสกัด RNA หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

สำหรับวัสดุ PS ที่นำไปเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาทั้งหมด 21 วัน นั้นจะใช้เป็นพื้นจานหลุม 96 well plate เป็นกลุ่มควบคุมด้านระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีกระบวนการทดลองคล้ายกับที่ใช้กับวัสดุสังเคราะห์ทั้ง 4 ชนิด โดยไม่ต้องใส่แผ่นวัสดุใดๆลงไปที่ก้นหลุม แต่ใช้ก้นหลุมเป็นวัสดุ PS ได้เลย การเพาะเลี้ยงเซลล์จึงทำในจาน PS นั้น ส่วนการสกัด RNA ทำโดยการเติม Trizol® reagent ปริมาตร 100 μ l ลงไปในแต่ละหลุม คูดสารละลายที่ได้ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย Trizol® reagent ให้ครบ 500 μ l ก่อนนำไปสกัด RNA และในส่วน of วัสดุ PS วันที่ 0 นั้น เป็นกลุ่มควบคุมด้านสภาวะปกติในการเพาะเลี้ยง ซึ่งสามารถใช้เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในภาวะปกติ ไปสกัด RNA ได้เลยโดยไม่ต้องนำเพาะเลี้ยงใน 96 well plate อีก

2) การสกัด RNA

RNA มีคุณสมบัติที่ไวต่อการถูกทำลาย เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลไรโบสสายเดี่ยว ดังนั้นกระบวนการในการสกัด RNA จึงต้องทำที่อุณหภูมิต่ำหรือประมาณ 4 °C (เกวลิน, 2551) โดยการทดลองครั้งนี้ ได้ใช้ชุดทดลอง Nucleo Spin® RNA XS kit เพื่อสกัด RNA

1. นำเซลล์ที่เตรียมได้มาเติมด้วย Trizol® reagent ปริมาตร 200 μ l แล้วดูดเป่าให้สารละลายเข้ากัน
2. คูดสารละลายทั้งหมดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ จากนั้นจึงเติม chloroform ปริมาตร 200 μ l แล้ว vortex เป็นเวลา 10 วินาที

หรือจนกระทั่งสารละลายผสมกันดี จากนั้นจึงนำไปแช่ไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที

3. นำไปปั่นตกตะกอนในเครื่อง thermo-centrifuge ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที
4. ก่อๆ ดูดสารละลายด้านบนออกมาใส่ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วทำการสกัด RNA ตามคู่มือของชุด kit
5. เก็บ RNA ที่ได้ไว้ในที่อุณหภูมิ -80 °C
6. ตรวจสอบ RNA ที่สกัดได้ด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer โดยใช้กำลังไฟ 75 watt เป็นเวลา 45 นาที
7. ย้อม agarose gel ด้วย 0.5% (v/v) ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 10 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV-transilluminator เพื่อวิเคราะห์คุณภาพของ RNA ที่สกัดได้

3) การสังเคราะห์ cDNA

นำ RNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.5.4 (2) มาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ ReverTra Ace - α -[®] reverse transcriptase ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาใน PCR tube ดังตาราง 3.2
2. นำสารละลายใน PCR tube (ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 μ l) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 99°C เป็นเวลา 5 นาที และเก็บพักไว้ที่ 4 °C
3. แบ่ง cDNA บางส่วนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) และส่วนที่เหลือก็เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

4) การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ cDNA

โดยการเจือจางสารละลาย cDNA จากตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณ โดยผสมน้ำกลั่นปริมาตร 998 μl กับสารละลาย cDNA ปริมาตร 2 μl ใน microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปคำนวณ หาค่าความบริสุทธิ์ของ cDNA ($\text{OD}_{260/280}$) และค่าความเข้มข้นของ cDNA (ภาคผนวก ค) เพื่อใช้ในการปรับปริมาณ cDNA ให้เท่ากับ 100 ng/ μl ก่อนนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

5) การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน

ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR โดยการนำ cDNA ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากสายสะดือ (BCP-K1) ที่เลี้ยงบนวัสดุทั้ง 5 ชนิด มาปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 100 ng/ μl ก่อนนำไปศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษา (ตาราง 3.2) โดยผสมสารต่าง ๆ ตามคำแนะนำที่แนบมาพร้อมชุดทดลอง (ตาราง 3.3) นำสารทั้งหมดผสมกันลงใน PCR tube ขนาด 200 μl แล้วหยอดสารลงไปในหลุม จากนั้นเริ่มปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง EcoTM Real-Time PCR System โดยทำตามคู่มือ SensiFASTTM SYBR[®] No-ROX Kit แล้ววิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ตามวิธีการของ Haimes *et al* (2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละคู่และอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing (ที่มา: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606>)

ยีน	accession number	ลำดับเบสของ primer (5'→ 3')	อุณหภูมิ Annealing (°C)
<i>GAPDH</i>	NM_002046.4	Fw-TGCTGGCGCTGAGTACGTCG Rv- TGACCTTGGCCAGGGGTGCT	60
<i>caspase8</i>	NM_001228.4	Fw-TGCAGGGGCTTTGACCACGA Rv-TGGGGGCCTCCTGTCCATCA	60
<i>bcl-2</i>	NM_000633.2	Fw-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG Rv-TCACTTGTGGCTCAGATAGG	60
<i>PARP-1</i>	NM_017915.3	Fw-AATCTCCAGGGGGTAGAACT Rv-CAGAGCCTGTTGAAGTTGTG	60
<i>Pou5F1</i>	NM_002701.4	Fw-ACTGTGTCCCAGGCTTCTTT Rv-CCATTTTGGTACCCCAGGCT	65
<i>SSEA-4</i>	NM_203289.4	Fw-GCCCTAGAACTCCAATCACA Rv-CCCAGATGGTATTGGACACA	60
<i>Nestin</i>	NM_006617.1	Fw-TCCTGCTCGCTCTCTACTTT Rv-GGAAGAGGTGATGGAACCAC	60
<i>PPARγ2</i>	NM_138712.3	Fw-GCATTATGAGACATCCCCACTGC Rv-CCTATTGACCCAGAAAGCGATTC	65
<i>SOX9</i>	NM_000346.3	Fw- CCCTTCAACCTCCCACACTAC Rv-TCCTCAAGGTCGAGTGAGCTG	60
<i>COL2A1</i>	NM_001844.4	Fw-GCTCCCAGAACATCACCTACC Rv-TGAACCTGCTATTGCCCTCT	65
<i>Aggrecan</i>	NM_001135.3	Fw-TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC Rv-GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA	60

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมในการสังเคราะห์ cDNA ใน PCR tube

สาร	ปริมาตร (μl)
RNase free H ₂ O	6.0
5x RT buffer	4.0
10 mM dNTP mixture	2.0
oligo (dT)20 or Random hexamer	1.0
RNase inhibitor (10 U/μl)	1.0
Template RNA	5.0
ReverTra Ace	1.0
Total	20.0

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมในปฏิกิริยา real-time -PCR

สาร	ปริมาตร (μl)
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	10.0
10 μM forward primer	0.8
10 mM reward primer	0.8
Template DNA	3.4
dH ₂ O	5.0
Total	20.0

3.6 การชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน

ในการทดลองนี้จะใช้สารอาหารชักนำสำเร็จรูป STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, USA) เพื่อชักนำเซลล์ BCP-K1 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนวัสดุ ให้เกิดการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน รายละเอียดของการทดลองมีดังนี้

1. ทำการ trypsinization (ภาคผนวก ก) เซลล์ที่เกาะอยู่บนวัสดุทั้งหมด ให้หลุดออกมาเป็นเซลล์แขวนลอย หลังจากนั้นนำเซลล์ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1,100 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 รอบ

2. ดูด PBS ออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ลงไป หลังจากนั้นนับจำนวนเซลล์ แล้วปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับ 1.6×10^7 cell/ml เพื่อเพาะเลี้ยงลงไปในวัสดุเลี้ยงโดยค่อย ๆ หยดเซลล์ลงไป ระวังอย่าให้มีของเหลวหลุดออกมาจากวัสดุเลี้ยง
3. นำเซลล์ที่อุบ่นวัสดุไปเพาะเลี้ยงในตู้บ CO₂ โดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เริ่มยึดเกาะกับวัสดุเลี้ยง หลังจากนั้นค่อย ๆ ดูดอาหารเลี้ยงทิ้งไป
4. เติมอาหารชักนำที่อุ่นไว้มา เติลงไปในวัสดุแต่ละชนิด โดยค่อย ๆ หยดลงไป เพื่อไม่ให้เซลล์ที่เกาะอยู่หลุดออกมา แล้วนำกลับไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้บ CO₂ ทำการเปลี่ยนอาหารชักนำทุก ๆ 2-3 วัน จนครบวันที่ 21 ของการเลี้ยง

3.7 การตรวจสอบความเป็นเซลล์กระดูกอ่อน

การทดลองนี้จะใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกอ่อน ด้วยเทคนิค real-time PCR ได้แก่ ยีน *SOX9*, *COL2A1* และ *Aggrecan* ซึ่งมีกระบวนการทดลองตามหัวข้อ 3.5.4

3.7.1 การย้อมสี Toluidine blue (Johnstone *et al.*, 1998)

เป็นสีย้อมที่ใช้ย้อม proteoglycans และ glycosaminoglycans ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันกระดูกอ่อนซึ่งจะย้อมติดติดสีน้ำเงินหรือสีม่วง มีกระบวนการทดลอง ดังนี้

1. ดูดสารละลายออกจากเซลล์ที่เลี้ยง แล้วเติม 10% (v/v) formalin เป็นเวลา 30 นาที
2. เมื่อครบเวลาแล้วดูดสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ รอบละ 5 นาที
3. ย้อมสีด้วย 0.1% (v/v) Toluidine blue 30 นาที หลังจากนั้นนำไปถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.7.2 การย้อมสี Alcian blue (Atsumi *et al.*, 1990)

1. ดูดสารละลายออกจากเซลล์ที่เลี้ยง แล้วเติม 4% (v/v) formalin เป็นเวลา 30 นาที
2. ดูดสารละลายทิ้งไป แล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 รอบ รอบละ 5 นาที
3. ย้อมด้วยสี 1% (w/v) Alcian Blue เป็นเวลา 30 นาที
4. ดูดสารละลายทิ้ง แล้วเติม 0.1 N HCl ลงไป หลังจากนั้นนำไปถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลเชิงปริมาณและตัวเลขทั้งหมดถูกนำเสนอในรูปของ $\text{mean} \pm \text{SE}$ การทดลองทั้งหมด มีจำนวนซ้ำทั้งหมดอย่างน้อย 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบข้อมูลกับกลุ่มการทดลองที่เป็น PS หรือ cover glass ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการทดลอง นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยเทคนิค one-way ANOVA ตามด้วย multiple comparison โดยใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p \leq 0.05$)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved