บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การจัดหาตัวอย่างเส้นไหม

3.1.1 ตัวอย่างเส้นไหมในประเทศไทย ซึ่งสามารถแยกออกเป็น 2 ชนิด คือ เส้นไหมเหลือง และเส้นไหมขาว ซึ่งเส้นไหมขาวจะตรงกับวัตถุประสงค์ในการเลือกใช้มากกว่าเส้นไหมเหลือง โดยที่งานทดลองนี้ใช้เพียงเฉพาะเส้นไหมดิบขาว ซึ่งพันธุ์ไหมที่ใช้เป็นพันธุ์ไหมผสมไทย – จีน ความหนาของเส้นไหม 21 Dinier จากบริษัท บดินทร์ไหมไทย–โคราช อ.ปักธงชัย จ. นครราชสีมา

3.1.2 การเตรียมตัวอย่างไฟโบรอินเบื้องต้น และการวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

ในการทดลองครั้งนี้เตรียมตัวอย่างไฟโบรอิน โดยนำเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวไหม ทำละลายด้วยสารละลายผสมดัดแปลงจากวิธีของ Ajisawa ($CaCl_2$: H_2O: $Ca(NO_3)_2$: C_2H_5OH ในอัตราส่วน 8:9:1:4 ตามลำดับ) (Yamada et al., 2001) ซึ่งอัตราส่วนในการทำละลายเส้นไหมต่อสารทำละลายเป็น 9:100 โดยน้ำหนัก ให้ความร้อนด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ที่มีความถี่ในช่วง 1.6 -30 GHz และมีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 187- 10 mm.หรือเทียบเท่า จะได้สารละลายไฟโบรอินใส จากนั้นทำการกำจัดเกลือโดยใช้วิธี dialysis ผ่านเยื่อกรองเมมเบรนที่มีขนาดรู 10,000 MW ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นทำแห้งโดยวิธี freeze dry จะได้ผงไฟโบรอิน หรือ fibroin powder ตามที่ต้องการ จัดเก็บในถุงที่ปิดสนิท (ดัดแปลงจาก: Lin et al., 2008)

การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

วิเคราะห์ปริมาณเกลือตามวิธี AOAC (2000)

โดลใช้สารละลายเส้นใยไหมธรรมชาติที่ผ่านการกำจัดเกลือออกแล้ว ปริมาตร 5.0 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml. เติม 0.1 N $AgNO_3$ ปริมาตร 15.0 ml. แกว่งผสมให้เข้ากัน และเติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 10.0 ml.ต้มให้เดือด จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50.0 ml. เติม ferric alum indicator 5.0 ml. แกว่งผสมให้สารละลายเข้ากัน นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N Potassium thiocyanate (KSCN) จนได้จุดยุติสีน้ำตาลอ่อน และคำนวณปริมาณเกลือจากสูตร

ปริมาณเกลือคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก = $\frac{(A - B) \times N \times 0.05845 \times 100}{W}$

เมื่อ A = ปริมาตร $AgNO_3$ ที่ใช้ (ml)

B = ปริมาตร KSCN ที่ใช้ (ml)

N = ความเข้มข้นของ KSCN (N)

0.05845 = factor

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (g)

3.2 การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มผสมพอลิเมอร์

การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินด้วยผงไฟโบรอิน จากวิธีการดัดแปลงจาก Um and Park (2007) ; Li et al. (2002) ; US5951506 (2004).

จากการที่ได้ผงโปรตีนไฟโบรอินละลายเป็นสารละลายไฟโบรอิน1.5% ผสมสารพอลิเมอร์เข้มข้น3% จำนวน 3 ชนิดคือ Polyvinyl alcohol (PVA), Poly ethylene oxide (PEO) และ Sodium alginate (AG) ในส่วนผสมของแผ่นฟิล์มผสมโดย ใช้อัตราส่วนผสมสารพอลิเมอร์ต่อโปรตีนไฟโบรอิน 100:0, 70:30, 50:50 และ 30:70 ตามรายละเอียด ดังนี้

PEO 100: 0 Polyethylene oxide 100 ส่วน: Fibroin 0 ส่วนโดยน้ำหนัก

PEO 70: 30 คือ Polyethylene oxide 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก

PEO 50: 50 คือ Polyethylene oxide 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก

PEO 30: 70 คือ Polyethylene oxide 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก

AG 100: 0 คือ Sodium alginate 100 ส่วน: Fibroin 0 ส่วนโดยน้ำหนัก

AG 70: 30 คือ Sodium alginate 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก

AG 50: 50 คือ Sodium alginate 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก

AG 30: 70 คือ Sodium alginate 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก

PVA 100: 0 คือ Polyvinyl alcohol 100 ส่วน: Fibroin 0 ส่วนโดยน้ำหนัก

PVA 70: 30 คือ Polyvinyl alcohol 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก

PVA 50: 50 คือ Polyvinyl alcohol 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก

PVA 30: 70 คือ Polyvinyl alcohol 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก

จากนั้นเมื่อผสมเข้ากันแล้วตามแต่ละอัตราส่วน นำสารละลายเทลงบน Polystyrene plate ให้มีความหนาประมาณ 2-3 mm.จากนั้นนำ plate ที่ได้ทำการเคลือบสารละลายผสม ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40-50 °C เป็นเวลา ข้ามคืนจากนั้นทำการลอกแผ่นฟิล์มแล้วนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพต่อไป และเพื่อคัดเลือกสูตรที่คาดว่าเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นแผ่นฟิล์มปิดแผลในสัตว์ทดลองต่อไป

3.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

3.3.1 การวัดลักษณะ Mechanical testing

เมื่อได้แผ่นฟิล์มที่ต้องการ นำมาวัดค่า Mechanical testing ซึ่งประกอบไปด้วย Yong's modulus tensile strength และ % elongation โดยดัดแปลงวิธีการจาก Biman, et al. (2009); Li et al. (2002); และมาตรฐานการทดสอบพอลิเมอร์ ASTM D882.

โดยที่ ตัดแผ่นฟิล์มในรูปของ dumble โดยตัดที่ช่วงกลางแผ่น ให้ได้ขนาด 30 mm x 10 mm หนา 1 mm และกำหนดค่าตัวจับยึดระหว่างตำแหน่งที่จับ 2 ด้านเป็นค่า distance 10 mm ใช้อัตราในการวัดเป็น 20 mm/min ทำ 3 ซ้ำ บันทึกค่า

การคำนวณค่า Strain rate (ASTM - D882, Thin Plastic Sheeting) ดังนี้

$$A = BC$$

A = อัตรา grip separation, mm (or in)/ min

B = กำหนดค่า distance ระหว่าง grip, mm (or in)

C = กำหนดค่า Strain rate, mm/mm· min (or in/in· min)

ค่า % elongation = ค่าความยืด ณ จุดขาด จะแสดงเป็นค่าร้อยละของความยาวเดิม

$$= \frac{\text{ค่า Final length} - \text{ค่า Initial Length}}{\text{ค่า Initial Length}} \times 100\%$$

3.3.2 การตรวจวัดคุณสมบัติด้วย SEM (Scanning Electron Microscope)

การวัดตัวอย่างฟิล์มโปรตีนผสมที่ได้จาก ไฟโบรอิน และสารพอลิเมอร์อื่น ๆ ที่ใช้เป็นส่วนผสมของแผ่นฟิล์ม สามารถสังเกตได้จากภาพถ่ายของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายให้เห็นถึงโครงสร้างภายในของวัตถุได้ โดยที่สามารถใช้กำลังขยายสูง ๆได้ โดยที่ตรวจวัดคุณสมบัติบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มและลักษณะการตัดขวางของแผ่นฟิล์ม (cross section) ซึ่งเครื่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รุ่น JSM-6400 Scanning Microscope ใช้คลื่นลำอิเล็กตรอน 10 kV ที่กำลังขยาย 500x บนพื้นผิวและกำลังขยาย 2,000x ของภาพตัดขวางของฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสมเพื่อดูลักษณะของโครงสร้างของการรวมตัวระหว่างสารพอลิเมอร์ และโปรตีนไฟโบรอิน ที่มีความหนาเฉลี่ยอยู่ที่

0.044 mm (อยู่ระหว่าง 0.03-0.06 mm) จากการเตรียมแผ่นฟิล์ม 15 ml/plate โดยเคลือบบน polystyrene plate ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C ข้ามคืนและเก็บไว้ที่ตู้ดูดความชื้นก่อนนำตัวอย่างไปตรวจวัดด้วย SEM (Um and Park, 2007)

3.3.3 การตรวจวัดคุณสมบัติ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ใช้เครื่องตรวจวัด Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รุ่น Perkin Elmer model Spectrum GX ใช้ รังสีอินฟราเรด wave number ในช่วง 4,000 – 400 cm^{-1} ซึ่งอยู่ในช่วง Middle Infrared คือช่วง wave number 4,000 – 200 cm^{-1} ที่สามารถให้ค่าการวัดที่ดีที่สุด การวัดค่า FTIR ของ SF powder ที่มีการวัดรูปแบบโครงสร้างสามรูปแบบ (random coil, α- helix and β-sheet) ของไฟโบรอิน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ สภาวะการเตรียมของตัวอย่างด้วย แต่ละโครงสร้างพันธะภายในของไฟโบรอินจะมีค่าการดูดกลืน FTIR spectrum ต่างกัน คือ ในรูปแบบโครงสร้าง β-sheet จะมีค่า การดูดกลืน FTIR spectrum ที่ 1630, 1530, 1265 และ 700 cm^{-1} ส่วนรูปแบบโครงสร้าง random coil / α- helix นั้นจะมีค่า 1660,1540,1265 และ 650 cm^{-1} ซึ่งค่า spectrum ของไฟโบรอินที่แสดงค่า strong absorption band ของ β-sheet ที่ 1630 cm^{-1} (amide I, CO ,and CN stretching), 1530 cm^{-1} (amide II), 1265 cm^{-1} (amide III, predominantly NH bending and CN stretching, plus other minor vibration modes), and 700 cm^{-1} (amide V,CN torsion, and NH bending) (พรพิมล ฮวดสุวรรณ์, 2553) หรือตามตารางสรุปค่า Spectrum ได้จาก FTIR ของโปรตีนไฟโบรอินดังตารางที่ 3.1 และตารางสรุปค่า spectrum ที่ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ที่รวบรวมจากงานวิจัยต่าง ๆ (ตามตารางที่ 3.2 เป็นต้นไป) ซึ่งจะได้เห็นค่าที่บ่งบอกความเหมือนกันของรูปแบบโครงสร้างตามค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 3.1 แสดง Vibrational band assigments for the amide I region of silk fibroin

Wave number range (cm-1)	Secondary structure assignment
1,605-1,615	(Try) side chains/aggregated strands
1,616-1,621	Aggregate β-strand/sheet (weak)[a]
1,622-1,627	β-sheets (strong)[a]
1,628-1,637	β-sheets (strong)[b]
1,638-1,646	Random coils/extended chains
1,647-1,655	Random coils
1,656-1,662	α- Helix
1,663-1,670	Turns
1,671-1,685	Turns
1,686-1,695	Turns
1,697-1,703	β-sheets (weak)[a]

[a] Intermolecular β-sheets; [b] Intramolecular β-sheets

ที่มา: Lawrence ,Omenetto , Chui , and Kaplan (2008)

ตารางที่ 3.2 ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy

Wave number range (cm-1)	Structure assignment
1229	Functional group of silk protein in solid state (Amide III)
1514	Functional group of silk protein in solid state (Amide II)
1620-1622	β-sheets (Amide I)
1646	Random coils (Amide I)
1662	α- Helix (Amide I)
1680	Turns (Amide I)
1697-1698	β-sheets (weak)[a] (Amide I)
3278	Functional group of silk protein in solid state (N-H stretching)

ที่มา: กาญจนา อุทัยฉาย, สนอง เอกสิทธิ์ และ ชูชาติ ธรรมเจริญ (2550)

ตารางที่ 3.3 ค่า Spectrumได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy

Wave number range (cm-1)	Structure assignment
650	Random coils (Amide V)
1235	Random coils (Amide III)
1265	β-from or silk II (Amide III)
1530	β-from or silk II (Amide II)
1540	Random coils (Amide II)
1630	β-from or silk II (Amide I)
1658	Random coils or silk I from (Amide I)

ที่มา : Yang, Zhang, and Park (2000)

ตารางที่ 3.4 ค่า Spectrumได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy

Wave number range (cm-1)	Structure assignment
1235	Non-crystalline (Amide III)
1540	Non-crystalline (Amide II)
1655	Non-crystalline (Amide II)

ที่มา : Um and Park (2007)

ตารางที่ 3.5 ค่า Spectrumได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy

Wave number range (cm-1)	Structure assignment
671	(Amide V) β-from
987	Gly-Ala
1014	Gly-Gly
1230	α- Helix (Amide III, C-N, N-H bond)
1521	β-from (Amide II, C-N, N-H bond)
1624	β-from (Amide I, C=O)

ที่มา : Sashina,Vnuchkin, and Novoselov (2006)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ค่าข้อมูลและเปรียบเทียบทางสถิติ (ANOVA) ใช้วิเคราะห์ค่า Tensile strength และ % elongation จะใช้โปรแกรมการคำนวณ SAS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range ที่ $p < 0.05$ (Acharya and Kundu., 2009)

3.5 การตรวจวัดประสิทธิภาพการเลี้ยงเซลล์ (Pre-cell culture test)

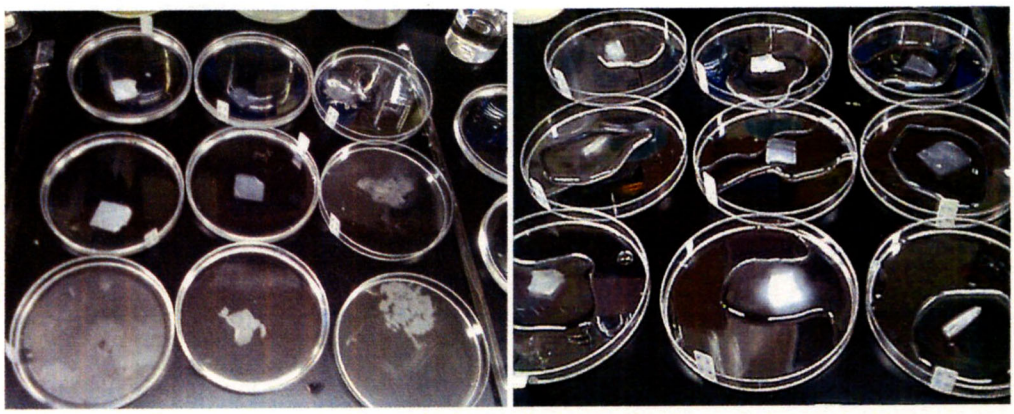
ทดสอบแผ่นฟิล์มไฟโบรอินสูตรต่างๆโดยการจุ่มกับ Methanol 30 นาทีเพื่อเหนี่ยวนำโครงสร้างของไฟโบรอิน silk I (random coil, Crankshaft model) ไปเป็น silk II (antiparallel β-sheet structure) หรือเป็นลักษณะwater- insoluble และให้มีสภาพคงทน (Li et al., 2008) ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนแช่ทดสอบด้วย Phosphate buffer เป็นเวลา 1-7 วัน ดังภาพที่ 3.1 เพื่อดูลักษณะการคงสภาพของแผ่นฟิล์มก่อนนำไปใช้ในการเลี้ยงเซลล์ โดยทดสอบแผ่นฟิล์มตามสูตร ดังนี้

PEO 70: 30 คือ Polyethylene oxide 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก
PEO 50: 50 คือ Polyethylene oxide 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก
PEO 30: 70 คือ Polyethylene oxide 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก
AG 70: 30 คือ Sodium alginate 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก
AG 50: 50 คือ Sodium alginate 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก
AG 30: 70 คือ Sodium alginate 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก
PVA 70: 30 คือ Polyvinyl alcohol 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก
PVA 50: 50 คือ Polyvinyl alcohol 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก
PVA 30: 70 คือ Polyvinyl alcohol 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก

ซึ่งผลที่ได้ในการทดสอบขั้นต้น พบว่า แผ่นฟิล์มที่สามารถคงสภาพได้ดีในสารละลาย Phosphate buffer คือ แผ่นฟิล์ม PEO 30:70 ที่คงตัวได้ดีที่สุด เพราะแผ่นฟิล์มสูตรอื่นๆไม่คงสภาพ มีลักษณะยุ่ยเละ ละลายน้ำได้เมื่อถูกแช่อยู่ใน Phosphate buffer นานอยู่ในช่วง 7 วัน ดังนั้นจึงทำการปรับเปลี่ยนสูตรอัตราส่วนในการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มโดยเลือกใช้ อัตราส่วนที่ต่ำกว่า ดังนี้

PEO 5: 95 คือ Polyethylene oxide 5 ส่วน: Fibroin 95 ส่วนโดยน้ำหนัก
PEO 10: 90 คือ Polyethylene oxide 10 ส่วน: Fibroin 90 ส่วนโดยน้ำหนัก
PEO 15: 85 คือ Polyethylene oxide 15 ส่วน: Fibroin 85 ส่วนโดยน้ำหนัก
PEO 20: 80 คือ Polyethylene oxide 20 ส่วน: Fibroin 80 ส่วนโดยน้ำหนัก
PEO 25: 75 คือ Polyethylene oxide 25 ส่วน: Fibroin 75 ส่วนโดยน้ำหนัก
PEO 30: 70 คือ Polyethylene oxide 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก

จากนั้นนำไปทดสอบจุ่มกับ Methanol 30 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนแช่ด้วย Phosphate buffer เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูลักษณะการคงสภาพของแผ่นฟิล์มก่อนนำไปใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต่อไป



ภาพที่ 3.1 แสดงตัวอย่างในการทดสอบ pre-cell culture โดยดูลักษณะการเปื่อยยุ่ยของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ต่างๆ

3.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นฟิล์ม (cell culture test)

สูตรตำรับแผ่นฟิล์มที่ใช้ในการทดสอบ (จากการทดสอบในขั้นที่สองและเลือกเฉพาะสูตรที่สามารถคงตัวได้นานที่สุด) คือ

1. FB/PEO (90:10)
2. FB/PEO (85:15)

เซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

Human foreskin fibroblast (HFF-1, ATCC#SCRC-1041, American Types Culture collection, VA, USA)

สารเคมี

1. DMEM (high glucose, product number D5648, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
2. Fetal bovine serum (Gibco, Carifornia, USA)
3. Penicillin/streptomycin (Gibco, Carifornia, USA)
4. Ethanol (AR grade, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
5. Methanol (AR grade, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
6. Glutaraldehyde solution (25%, Grade II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
7. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, Uultra pure grade, Amesco®, Ohio, USA)
8. Dimethyl sulfoxide (AR grade, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)

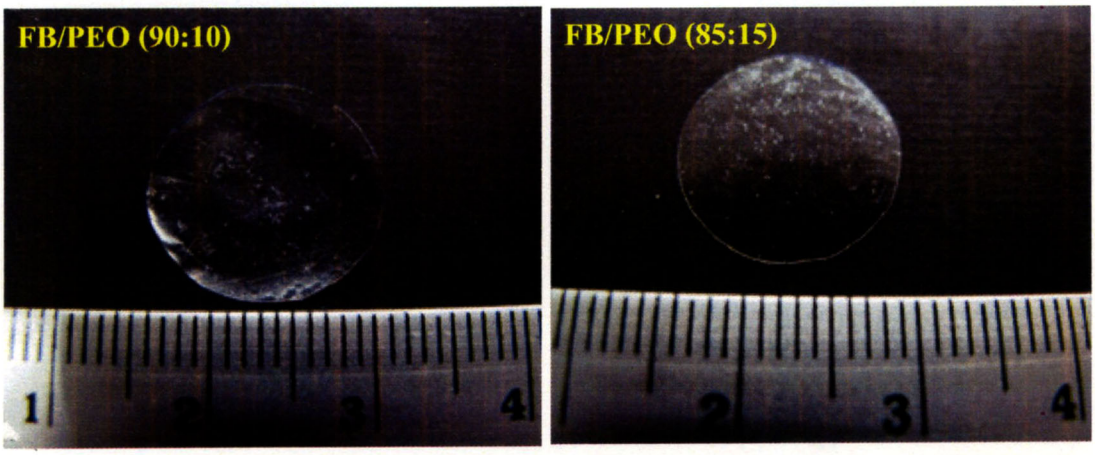
เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

1. Tissue culture flask (nunc^{TM}, NUNC A/S, Roskilde, Denmark)
2. 24 well plate (Costar®, Corning Incorporated, NY, USA)
3. Cover glasses (Menzel-Glaser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Germany)
4. Microplate spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Becman Coulter Inc., Fullerton, USA)
5. Scaning Electron Microscopy (1455VP, LEO Electron microscopy Ltd., Cambridge, UK)
6. CO_2 incubator (Forma series II, Thermo Fisher Scienctific Inc., MA, USA)
7. Laminar flow hood (Heal force®, HF safe 1200/c+, Shanghai, China)

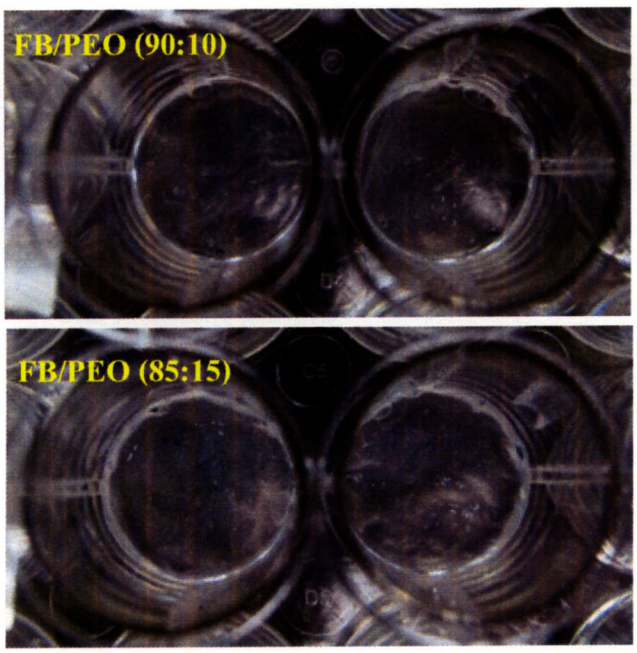
3.5.2 วิธีการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์บนแผ่นฟิล์ม

ในการทดลองเบื้องต้นสำหรับการเตรียมแผ่นฟิล์มก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น ต้องนำแผ่นฟิล์มมาทำการตัดให้มีขนาดพอดีกับภาชนะที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งในการทดลองนี้ ดัดแปลงวิธีจาก Sangsanoh et al. (2010) โดยภาชนะที่เลือกใช้ในการทดสอบคือ 24 well tissue culture plate ซึ่งแต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะของแผ่นฟิล์ม FB/PEO ทั้งสองสูตร คือ 90:10 และ 85:15 ที่ตัดให้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ซึ่งแผ่นฟิล์มทั้งสองชนิดมีลักษณะอ่อนนุ่มและยืดหยุ่นหลังจากได้แผ่นฟิล์มขนาดตามที่ต้องการแล้วจึงนำไปแช่ใน100% methanol เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเหนี่ยวนำให้แผ่นฟิล์มสามารถคงตัวอยู่ในน้ำได้ (water stable) จากนั้นผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยแผ่นฟิล์มที่ผ่านขั้นตอนนี้มีลักษณะค่อนข้างแข็งมากขึ้น ต่อมาจึงนำแผ่นฟิล์มนั้นมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการแช่ในสารละลาย 70% ethanol เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงล้าง ethanol ออก 2 ครั้งด้วยน้ำ sterile แล้วใช้ forceps คีบแผ่นฟิล์มไปวางในหลุมของ 24 well tissue culture plate ดังที่แสดงในภาพที่ 3.3 ซึ่งแผ่นฟิล์มมีลักษณะอ่อนนุ่มและแนบสนิทพอดีกับก้นหลุมของ 24 well plate จากนั้น

1. เติม DMEM free serum ลงไป 500 µL แล้วนำไป incubate ในตู้ CO_2 incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C, 5%CO_2 ข้ามคืน
2. ทำการ trypsinized cells โดยใช้ 0.05% trypsin EDTA จากนั้นจึงทำการนับจำนวนเซลล์
3. เติม cell suspension ปริมาตร 1 mL ลงใน 24 well plate ที่มีแผ่นฟิล์มอยู่ โดยให้มีเซลล์จำนวน 40,000 cells/well
4. นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ CO_2 incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2
5. เปลี่ยน medium ใหม่ ทุกๆ 2 วัน



ภาพที่ 3.2 แสดงรูปถ่ายของแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรที่ตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร



ภาพที่ 3.3 แสดงรูปถ่ายของแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรที่ผ่านการแช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย sterile water 2 ครั้งและถูกนำมาวางไว้ในหลุมของ 24 well plate เพื่อที่จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3.5.3 การศึกษาเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิค MTT assay (Method modified from Brunot et al., 2008)

1. เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ครบกำหนดเวลา 2, 8, 24 ชั่วโมง, 3, 5 และ7 วัน จึงทำการล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะอยู่บนแผ่นฟิล์มออก 2 ครั้ง ด้วย sterile PBS pH 7.4
2. จากนั้นใช้ forceps คีบเอาแผ่นฟิล์มออกไปใส่ในหลุมของ 24 well plate หลุมใหม่ เพื่อให้แน่ใจว่ามีแต่เซลล์ที่สามารถเกาะและเจริญอยู่บนฟิล์มเท่านั้น
3. เตรียมสารละลาย MTT ในอาหาร DMEM ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 mg/mL
4. เติมสารละลาย MTT ที่เตรียมไว้ลงในหลุม 24 well plate ปริมาตร 500 µl/well
5. นำไป incubate ในตู้ CO_2 incubator อุณหภูมิ 37°C, 5%CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. ใช้ pipette ดูดสารละลาย MTT ทิ้งไป และเติม DMSO ลงไป 500 µL เพื่อละลายตะกอน formazan ที่เกิดขึ้น สุดท้ายจะได้สารละลายสีม่วง
7. ใช้ pipette ดูดสารละลายสีม่วงที่เกิดขึ้นไปย้ายไปใส่ไน 96 well plate โดยใส่ปริมาตร 150 µL/well จากนั้นนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm

3.5.4 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม (Method modified from Sangsanoh et al., 2010)

1. เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ครบกำหนดเวลา 2, 8, 24 ชั่วโมง, 3, 5 และ7 วัน จึงทำการ fix cells บนแผ่นฟิล์มด้วย 3%glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน cover glass
2. เมื่อครบกำหนดเวลาจึงล้างแผ่นฟิล์มและ cover glass อีกครั้งด้วย sterile water
3. จากนั้นจึงนำแผ่นฟิล์มและ cover glass มาผ่านกระบวนการ dehydration ด้วยการแช่ใน 30%, 50%, 70%, 90% และ 100% ethanol ตามลำดับ โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 2 นาที
4. ทิ้งให้แผ่นฟิล์มและ cover glass แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry)
5. นำชิ้นตัวอย่างที่แห้งเรียบร้อยแล้วไปติดบน aluminum stub แล้วนำไป coat ด้วยทอง สุดท้ายจึงนำไปตรวจดูรูปร่างลักษณะและการยึดเกาะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)