บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมี

1. Chitosan น้ำหนักโมเลกุล 276,000 และมีการกำจัดหมู่แอซิทิล 94% จากบริษัท Sea Fresh ประเทศไทย
2. สารเคมีในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังนี้
    - RPMI Medium 1640 จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Foetal bovine serum EU Approved origin จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - L-glutamine, Penicillin, streptomycin, Gentamycin จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - OPTI-MEM จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - PBS buffer (NaCl, KCl, Na_2HPO_4) จากบริษัท Merck ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน
    - Hanks buffer จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - HEPES จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Glucose จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - EDTA-Trypsin, $MgSO_4$, $CaCl_2$ จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Bovine serum albumin จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Trypan blue จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - PBS buffer pH 7.4 จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Dimethyl sulphoxide (DMSO) จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. พลาสมิด pEGFP-C2 ซึ่งมี enhancing green fluorescent protein gene (GFP) gene จากบริษัท Clontech ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. สารเคมีสำหรับ สกัด pDNA Qiagen plasmid midi kits จากบริษัท Qiagen ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 1 Composition of buffers for QIAGEN® Plasmid Midi Kits

Buffer	Composition
Buffer P1 (resuspension buffer)	50 mM Tris.Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Buffer P2 (lysis buffer)	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)
Buffer P3 (neutralization buffer)	3.0 M potassium acetate, pH 5.5
Buffer QBT (equilibration buffer)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v) ; 0.15% Triton® X-100 (v/v)
Buffer QC (wash buffer)	1.0 M NaCl ; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)
Buffer QF (elution buffer)	1.25 M NaCl ; 50 mM Tris.Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)

5. MTT assay kit จากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Polyethylenimine (PEI) (Aldrich, Munich, Germany)
7. Sodium chloride (UNIVAR®Ajax Finechem; analytical reagent grade)
8. Casein enzyme hydrolysate, type-1; Tryptone (HIMEDIA® Himedia Laboratories Pvt. Ltd.)
9. Yeast extract powder (HIMEDIA® Himedia Laboratories Pvt. Ltd.)
10. Ethanol absolute (Scharlau® ET0016 Scharlau® Chemie SPAIN analytical reagent grade)
11. Reagents for gel electrophoresis
    - GenePure LE Agarose 500g (ISC BioExpress®, USA)
    - Blue/Orange 6x loading dye (Promega)
    - Lambda DNA / Hind III Markers (Promega) ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. เซลล์เพาะเลี้ยง Huh 7 cells (human hepatoma cell lines) จาก American Type Culture Collection ประเทศสหรัฐอเมริกา

วัสดุอุปกรณ์

1. Analytical balance รุ่น CP224S และรุ่น CP3020S บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Atomic Force Microscope (SPA4000 SUNDROOF HOUSING)
3. Autoclave รุ่น LS-2D บริษัท Hirakawa ประเทศไต้หวัน
4. Biohazard รุ่น Bio-II-A บริษัท Telstar ประเทศสเปญ
5. Centrifuge tubes จากบริษัท Gib-Thai ประเทศไทย
6. CO_2 incubator รุ่น HERA Cell 240 บริษัท Heraeus ประเทศเยอรมัน
7. DSC จากบริษัท Hewlett-Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. Eppendorf ® tubes จากบริษัท Gib-Thai ประเทศไทย
9. Gel documentation รุ่น MultiGenius บริษัท Syngene สหราชอาณาจักร
10. Protein and nucleic acid gel electrophoresis (MyRUN intelligent electrophoresis unit) บริษัท Cosmobio ประเทศญี่ปุ่น
11. Filtered membrane 0.22, 0.45 μm จากบริษัท Whatman ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Filtered pipet tip ขนาดต่าง ๆ จากบริษัท CLP ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Fusion™ Universal Microplate Analyzer รุ่น A153601 จากบริษัท Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Filter Set for Sterilization บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. Fluorescent Inverted Microscope รุ่น ECLIPSE TE 2000-U บริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น
16. FTIR จากบริษัท Nicolet ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. Hot Air Oven รุ่น EED บริษัท WTB Binder ประเทศเยอรมัน
18. High Speed Centrifuge รุ่น Biofuge Stratos บริษัท Sorvell ประเทศเยอรมัน
19. Incubator รุ่น 1050-1400 บริษัท Contherm Scientific Ltd ประเทศนิวซีแลนด์
20. Magnetic stirrer จากบริษัท Framo ประเทศเยอรมัน
21. Microcentrifuge รุ่น Spectrafuge 16M บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. Micropipette จากบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. NMR จากบริษัท Bruker ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
24. pH Meter รุ่น PP15 บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
25. Shaking incubator รุ่น 3031 บริษัท GFL ประเทศเยอรมัน
26. Spectrophotometer รุ่น Gene Ray บริษัท Biometra สหราชอาณาจักร
27. Speed vaccum รุ่น Dyna Vap V1000 บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
28. Tissue culture dishes บริษัท Nunc ประเทศ เดนมาร์ค
29. Tissue culture flasks บริษัท Nunc ประเทศ เดนมาร์ค

30. Tissue culture 6-well and 24-well plates บริษัท Nunc ประเทศ เดนมาร์ค
31. Tissue culture 96-well plates for fluorescence reading บริษัท Nunc ประเทศ เดนมาร์ค
32. Vortex mixer บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
33. Zetasizer Nano ZS จากบริษัท Malvern สหราชอาณาจักร

ระเบียบวิธีวิจัย

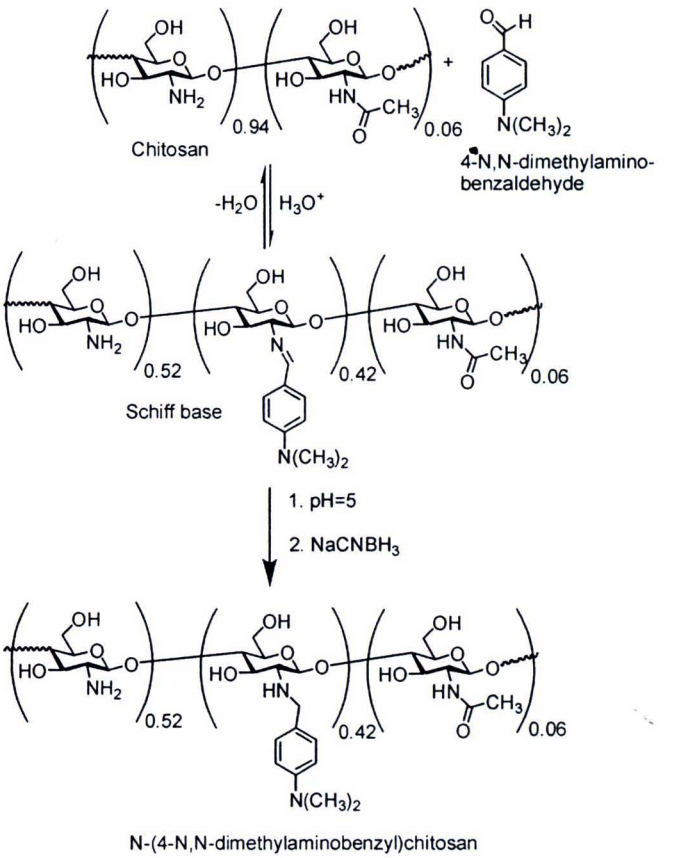
1. การเตรียมอนุพันธ์ไคโตซาน

1.1 การสังเคราะห์ *N*-(4-*N*,*N*-dimethylaminobenzyl)chitosan

1. นำไคโตซาน 1 กรัม ละลายในกรดแอซิติก 0.2 โมลาร์ (pH 4) 70 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้อง และเติมเอทานอล 70 มิลลิลิตร
2. เติม 4-*N*,*N*-dimethylaminobenzaldehyde 2.73 กรัม คนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ปรับ pH เป็น 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ และเติมโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดร์ 1.54 กรัม คนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ปรับ pH เป็น 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15 % w/v
5. กรองตะกอนที่ได้และล้างตะกอนด้วยเอทานอล
6. นำตะกอนที่ได้มาทำการสกัด soxhlet ด้วย เอทานอล:อีเทอร์ (1:1) เป็นเวลา 2 วัน
7. กรองและล้างตะกอนด้วยเอทานอลอีก 2-3 ครั้ง จะได้ *N*-(4-*N*,*N*-dimethylaminobenzyl)chitosan (แสดงวิธีการสังเคราะห์ ในรูปที่ 2)

1.2 เตรียม regenerated *N*-(4-*N*,*N*-dimethylaminobenzyl)chitosan

1. นำ *N*-(4-*N*,*N*-dimethylaminobenzyl)chitosan 0.5 กรัม ละลายในกรดแอซิติก1% w/v 100 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้อง
2. ใช้ หลอดหยดดูดสารละลาย *N*-(4-*N*,*N*-dimethylaminobenzyl)chitosan ลงในสารละลายผสมน้ำกับเมทานอล 2% (40:60) 100 มิลลิลิตร ขณะหยดสารละลายคนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้อง
3. ปรับ pH เป็น 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15 % w/v กรองและล้างตะกอนด้วยเมทานอลอีกครั้ง โดยให้ตะกอนที่กรองยังคงมีความชื้นอยู่ อย่ากรองให้แห้งมากไป เรียกส่วนนี้ว่า regenerated *N*-(4-*N*,*N*-dimethylaminobenzyl) chitosan

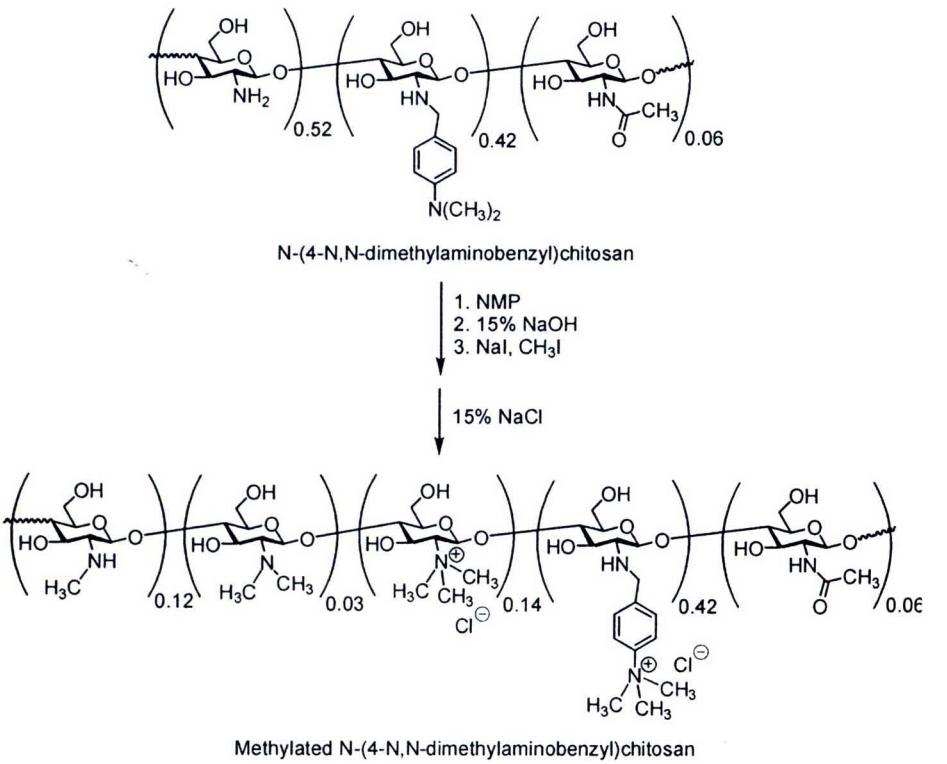


รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซาน N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl)chitosan

1.3 การสังเคราะห์ methylated *N*-(4-*N,N*-dimethylaminobenzyl) chitosan

1. นำ regenerated *N*-(4-*N,N*-dimethylaminobenzyl) chitosan ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในตัวทำละลาย N-methyl-2-pyrrolidole (NMP) 25 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง
2. เติมโซเดียมไอโอไดร์ 1.5 กรัม และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 % w/v 3 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
3. เติมไอโอโดมีเทน 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง คนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4. นำสารละลายไปตกตะกอนในแอซิโตน 300 มิลลิลิตร และละลายตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 15 % w/v
5. นำสารละลายที่ได้ทำ dialysis ในน้ำกลั่น 3 วันโดยเปลี่ยนน้ำทุกๆ 8 ชั่วโมง
6. นำสารละลายในถุง dialysis ไประเหยเอาน้ำออกภายใต้ความดันต่ำจนเหลือปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร และหลอดหยดดูดสารละลายลงในแอซิโตน 100 มิลลิลิตร
7. กรองตะกอนที่ได้และทำให้แห้งภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (แสดงวิธีการสังเคราะห์ ในรูปที่ 3) ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็น quaternization ของอนุพันธ์ไคโตซาน TM-Bz-CS



รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซาน trimethylated N-(4-N,N-dimethylamino benzyl) chitosan

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็น quaternization ของอนุพันธ์ไคโตซาน TM-Bz-CS

CS derivatives	ES (%)	NaOH (w/v) (%)	DQ(%)			DM-CS (%)	M-CS (%)	Recovery (%)
			DQ_{Ar} (%)	DQ_{CS} (%)	DQ_T (%)			
TM_{57}-Bz_{43}- CS	42.5	15	42.5	14.4	56.9	Trace	11.7	84.0
TM_{47}-Bz_{43}- CS	42.5	5	42.5	4.4	46.9	1.7	6.7	78.0
TM_{57}-Bz_{18}- CS	17.5	15	17.5	40.0	57.5	16.7	16.7	68.0

2. เตรียม Plasmid DNA

เพิ่มจำนวนพลาสมิค pEGFP-C2 ใน *Escherichia coli* และสกัดแยกพลาสมิค โดยใช้ชุดเตรียมสำเร็จรูป Qiagen Plasmid Midi Kit ดังนี้

วิธีเตรียม

1. เลี้ยง *E. coli* ใน LB Broth 25 ml เขย่า 250 รอบต่อนาที (rpm) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเซลล์ข้างบนทิ้ง เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์
2. นำตะกอนที่ได้มากระจายตัวในบัฟเฟอร์ P1 4 ml และเติมสารละลาย P2 4 ml พลิกกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในถังน้ำแข็ง จนเซลล์แตกตัวหมด ไม่เกิน 5 นาที เติมสารละสาย P3 4 ml เขย่าทันที 4-6 ครั้ง นำมาปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 15000 รอบต่อนาที (~17,900 x g) เป็นเวลา 30 นาที
3. ปิเปตส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ซึ่งมี plasmid ใส่ Qiagen column ที่ทำให้เปียกชื้นด้วย สารละลาย buffer QBT ตั้งทิ้งและรอจน supernatant ผ่าน column จนหมด
4. ล้าง column 2 ครั้ง ด้วย buffer QC ครั้งละ 10 ml
5. ทำการชะเอาพลาสมิคออกจาก column โดยเติม buffer QF 5 ml
6. ตกตะกอนพลาสมิคที่อุณหภูมิห้อง โดยเติม isopropanal 3.5 ml และนำไปปั่นตกตะกอนทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ปั่นล้างตะกอน 2 ครั้งด้วย 70% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง และปล่อยทิ้งไว้ให้แอลกอฮอลล์ระเหยไปหมด ละลายพลาสมิดด้วย 1XTE buffer 200 ul

7. วิเคราะห์หาความเข้มข้นของพลาสมิคโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

Plasmid concentration = 50 μg/ml x OD_{260nm} x DF

- โดยสารละลาย 50 μg/ml ของ double-stranded DNA มี OD_{260nm} เท่ากับ 1

- DF คือ dilution factor (เท่ากับ 20)

3. เตรียมคอมเพล็กซ์ของ PEI หรือ อนุพันธ์ไคโตซานกับ DNA

เตรียมสารละลาย PEI และอนุพันธ์ไคโตซาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับ DNA ที่อัตราส่วน N/P ต่างๆ โดยเติม DNA ลงในสารละลาย PEI หรืออนุพันธ์ไคโตซาน และผสมโดยปิเปตขึ้นลงเบาๆ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

การคำนวณ N/P ดังนี้

$$\text{N/P ratio} = \frac{\text{nmoles N}}{\text{nmoles P}}$$

$$\text{nmoles N of CS} = \frac{\text{amount of CS (μg)}}{\text{F.W. of CS}}$$

$$\text{nmoles P of pDNA} = \frac{\text{amount of pDNA (μg)}}{\text{M.W. of pDNA}}$$

F.W. ของ อนุพันธ์ไคโตซานคำนวนโดยใช้สมการดังนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 4 ก.ค. 2556
เลขทะเบียน 246855
เลขเรียกหนังสือ

F.W. ของอนุพันธ์ไคโตซาน = 0.06 (M.W. chitin) + DQ_{Ar} (M.W. of TM-Bz-CS) + DQ_{CS} (M.W. of TM-CS) + % DM-CS (M.W. of DM-CS) + % M-CS (M.W. of M-CS) + 161(0. 94–DQ_{Ar} – DQ_{CS} - % DM-CS - % M-CS)

Chitin; M.W. = 203.3

TM-Bz-CS; M.W. = 309

TM-CS; M.W = 204

DM-CS; M.W. = 189

M-CS; M.W. = 175

ตัวอย่างการคำนวณ F.W. ของ TM_{57}-Bz_{43}-CS

F.W. ของ TM_{57}-Bz_{43}-CS = 12.2 + 0.425 (309) + 0.144 (204) + 0.117 (175) + 161 (0.94-0.425-0.144-0.117)

= 234.27

F.W. แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดง F.W. ของอนุพันธ์ไคโตซาน.

CS derivative	F.W.
TM_{57}-Bz_{43}-CS	234.27
TM_{47}-Bz_{43}-CS	229.75
TM_{57}-Bz_{18}-CS	213.65
TM_{43}-CS	195.68
CS	161

ในการทดลองนี้ได้ใส่ pDNA 1.0 μg

average M.W. of pDNA = 330 g

$\therefore$ nmoles P of pDNA = $\frac{1\ \mu g\ of\ pDNA}{330\ g}$

= 3.03×10^{-3} μmoles P

= 3.03 nmoles P

ตัวอย่างการคำนวณ N/P ratio ของ pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes โดยใช้ TM_{57}-Bz_{43}-CS = 1.0 μg

$$\text{nmoles N of CS} = \frac{\text{amount of CS (μg)}}{\text{F.W. of CS}}$$

$$= \frac{\text{1.0 μg of } TM_{57}\text{-}Bz_{43}\text{-CS}}{234.27}$$

$$= 4.27 \times 10^{-3} \text{ μmoles N}$$

$$= 4.27 \text{ nmoles N}$$

$$\text{N/P ratio} = \frac{\text{4.27 nmoles N}}{\text{3.03 nmoles P}}$$

$$= 1.423 \simeq 1.5$$

N/P ratio ของไคโตซานและอนุพันธ์ไคโตซานแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณ CS (μg) ต่อ ปริมาณ DNA (μg) และ N/P ratio

DNA	CS	N/P ratio				
(μg)	(μg)	CS	TM_{57}-Bz_{43}-CS	TM_{47}-Bz_{43}-CS	TM_{57}-Bz_{18}-CS	TM_{43}-CS
1	0.5	1	0.7	0.7	0.8	0.8
1	1	2	1.5	1.5	1.5	1.5
1	2	4	3	3	3	3
1	4	8	6	6	6	7
1	6	12	8	9	9	10
1	8	16	11	11	12	13
1	12	24	17	17	19	20
1	16	32	23	23	25	27
1	24	48	34	34	37	40

1	32	64	45	46	49	54

4. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของอนุพันธ์ไคโตซาน/DNA คอมเพล็กซ์ ที่ N/P อัตราส่วนต่าง ๆ

4.1 หาอัตราส่วนที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสมบูรณ์โดยวิธี gel retardation assay ดังนี้

Reagents for gel electrophoresis

1. 6x Loading dye

   0.25% (w/v) bromophenol blue

   0.25% (w/v) xylene cyanol FF

   30% (w/v) glycerol

2. 1x TBE-1 L

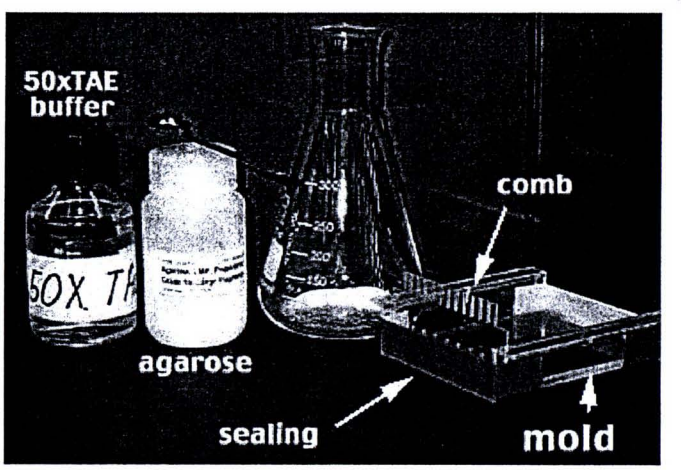
   Tris base (F.W. 121.4) 10.8 g

   Boric acid 5.5 g

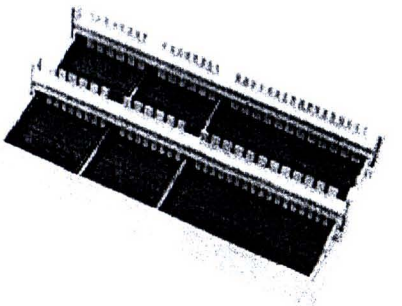
   0.5 M EDTA pH 8.0 1 มิลลิลิตร

   Bring volume up to 1 L with ddH2O

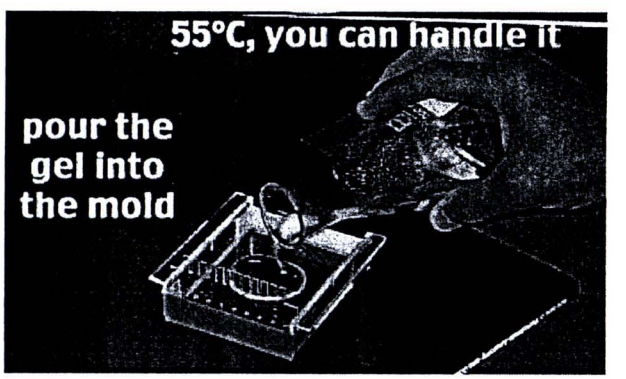
วิธีทำ Gel electrophoresis DNA



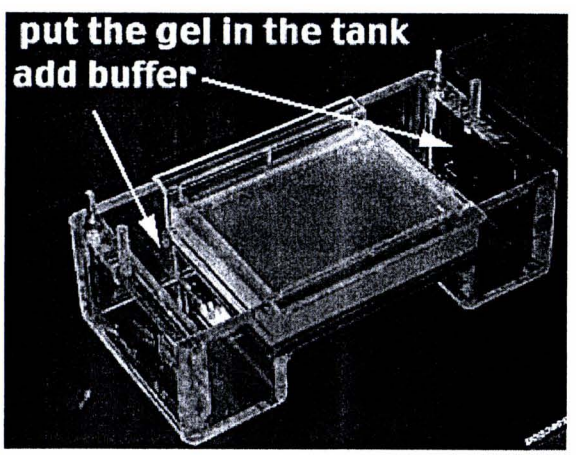
1. ชั่ง 0.24 กรัม อะกาโลส ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม TBE 30 มิลลิลิตร (0.8 %)
2. ใส่ในตู้อบไมโครเวฟประมาณ 0.5 นาที 2 ครั้ง เพื่อให้ อะกาโลส ละลาย อุ่นขวดรูปชมพู่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส
3. นำ rubber stoppers ใส่ทั้งสองข้างของถาดเจลและใส่ comb ในถาดเจล



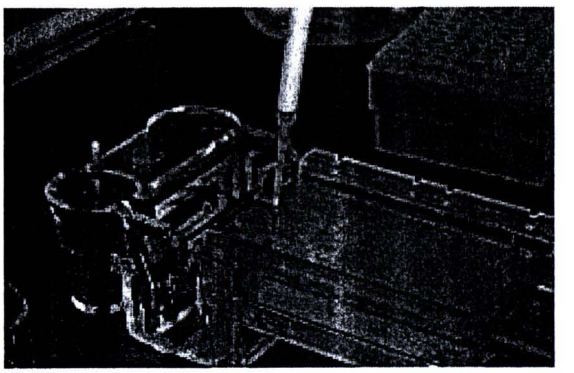
4. ค่อยๆ เทเจลอะกาโลส ช้า ๆ ในถาดเจล เมื่อเจลแข็งตัวแล้วเติม TBE buffer ดึง comb ออก เอา rubber stoppers ออก



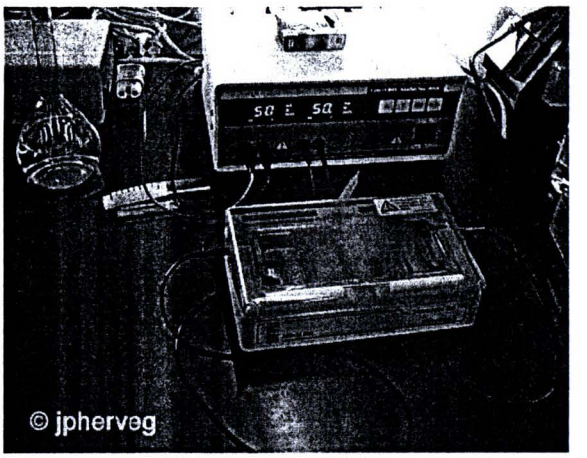
5. นำเจลใส่ใน electrophoresis box เติม 1x TBE buffer จนท่วมเจล



6. เตรียมคอมเพล็กซ์ DNA กับอนุพันธ์ไคโตซาน ที่ N/P ratio ต่าง ๆ ปริมาตร 10 μL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หยอดคอมเพล็กซ์10 ไมโครลิตร โดยใส่ loading dye 2 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลุม



7. ต่อเข้ากับตัวเครื่อง โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)



8. ตรวจสอบด้วยเครื่อง gel documentation และบันทึกภาพไว้

4.2 วัดประจุและหาขนาดของอนุภาคด้วยเครื่อง Zeta potential measurement

วัดประจุและขนาดของอนุภาคของ PEI หรือ อนุพันธ์ไคโตซาน/DNA คอมเพล็กซ์ ที่ N/P อัตราส่วนต่างๆ ด้วย เครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) โดยนำตัวอย่างคอมเพล็กซ์ที่เตรียมได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน

4.3 ตรวจสอบรูปร่างของคอมเพล็กซ์ด้วย Atomic Force Microscope (AFM)

ดูรูปร่างและลักษณะของคอมเพล็กซ์ siRNA/เกลือไคโตซาน โดยใช้เครื่อง AFM โดยนำตัวอย่างคอมเพล็กซ์ที่เตรียมได้มาเจือจางด้วย DEPC water ที่กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นหยดสารตัวอย่างลงบน mica ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำเข้าเครื่อง AFM

5 ทดสอบประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน

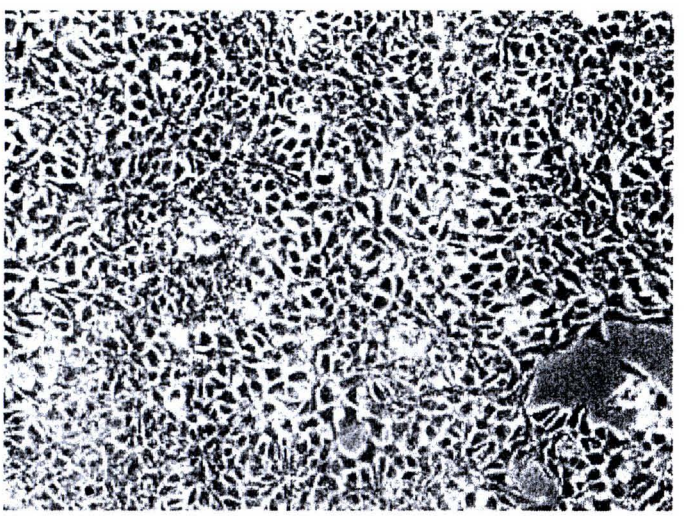
5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ cell line (Huh 7 cells) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซนต์ คาร์บอนไดออกไซด์

– ใน TC-flasks

Culture complete medium ประกอบด้วย RPMI Medium 1640 ซึ่งเติม 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acid, 1% L-glutamine, 0.1% penicillin G/streptomycin และ Sodium bicarbonate เปลี่ยน medium สัปดาห์ละ 1- 2 ครั้ง

– ใน 24- well plates

นำ Huh 7 cells ที่โต 70-90% Confluence (รูปที่ 4) ทำการ subculture 2-3 ครั้ง ด้วย trypsin-EDTA solution ถ่ายใส่ใน 24- well plates



รูปที่ 4 แสดง Huh7 cells ที่เพาะเลี้ยงใน TC-flask ขนาด 75 cm^2 (image 10× objective using an inverted microscope)

5.2 ทดสอบประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำอนุพันธ์ไคโตซานที่เตรียมได้มาคอมเพล็กซ์กับ plasmid DNA ที่ N/P อัตราส่วนต่าง ๆ เป็นเวลา 15 นาทีก่อนเติมในเซลล์เพาะเลี้ยง นำมาทดสอบการนำส่งยีนเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้เซลล์ 5 X 10^4 cells/well ใส่ใน 24- well plates เพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ 5 เปอร์เซนต์ คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ได้เซลล์ที่ 65-70% Confluence ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเปลี่ยนเป็น serum free medium เติมสารที่จะทดสอบลงไป โดยมี plasmid DNA 1 ไมโครกรัมต่อ 1 well นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 37° C ภายใต้ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเติม medium นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 37° C ภายใต้ 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนคือโปรตีนที่ผลิต green fluorescent โดยใช้วิธีนับจำนวนเซลล์ที่มีสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เป็นแสง fluorescent

6 ศึกษาความเป็นพิษ

ศึกษาความเป็นพิษโดยวิธี MTT assay ดังนี้

นำ Huh 7 cells ที่มีการเจริญเติบโตประมาณพื้นที่ 70-90% ของเพลท (70-90 % Confluence) โดยใช้เซลล์ 5 X 10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ถ่ายใส่ 96 well cell culture plates และ pre-incubated เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงก่อนทดสอบ จากนั้นเติมอนุพันธ์ไคโตซานที่คอมเพล็กซ์กับ plasmid DNA ที่อัตราส่วน N/P ต่างๆ ทำเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 5.2 ภายหลัง transfection 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 2 ครั้งและเปลี่ยนเป็น fresh cell culture medium และใส่ตู้อบเป็นเวลานาน 4 ชั่วโมงเพื่อรักษาสภาพเซลล์ นำเซลล์มาผสมกับ 20 ไมโครลิตร MTT (0.5 mg/มิลลิลิตร MTT in DMEM) เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง ขั้นตอนสุดท้ายให้ดูด สารละลายตัวกลางออกแล้วละลาย formazan crystal ด้วย 100 ไมโครลิตรของ DMSO ต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability)