สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

รายการอุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมีพร้อมทั้งรายละเอียดของผู้ผลิตได้รวบรวมไว้ในภาคผนวกก และวิธีการเตรียมสารเคมีได้รวบรวมไว้ในภาคผนวก ข

เพื่อให้การดำเนินการวิจัยบรรลุตามวัตถุประสงค์จึงได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ (3.1)การพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน(3.2)การตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติและ (3.3)การตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวัน ซึ่งมีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้

3.1 การพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

ในการพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งมาตรวจสอบฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน มีขั้นตอนย่อย 3 ขั้นตอน คือ (3.1.1)การคัดเลือกเซลล์เชื้อสายมะเร็งที่ใช้เป็นโมเดลในการทดลอง โดยนำเซลล์มะเร็งที่มีรายงานว่าสามารถตอบสนองต่อฮอร์โมนเอสโตรเจนจำนวน 3 เชื้อสายมาเปรียบเทียบ การตอบสนองต่อ 17β-estradiol ซึ่งเป็นเอสโตรเจนชนิดหนึ่ง และเลือกเซลล์เชื้อสายที่ตอบสนองดีที่สุดเพียง 1 เชื้อสาย (3.1.2)นำเซลล์ที่คัดเลือกเป็นโมเดลมาทดสอบการตอบสนองต่อสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่เป็นสารมาตรฐาน และ (3.1.3)การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนและในวิถีอื่นที่ให้ผลการตอบสนองใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าการตอบสนองของสารมาตรฐาน (ในข้อ 3.1.2) เป็นการแสดงฤทธิ์ผ่านวิถีเอสโตรเจนหรือไม่ กระบวนการพัฒนาทั้ง 3 ขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 การคัดเลือกเซลล์เชื้อสายเป็นโมเดลในการทดสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

เซลล์เชื้อสายมะเร็งที่จะนำมาคัดเลือก ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa (human epithelial cervical cancer cell line) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเต้านม(human breast adenocarcinoma cell line) 2 เซลล์เชื้อสาย คือ MCF-7 และ MDA-MB-231โดยคัดเลือกเซลล์ที่มีการตอบสนองต่อการรับกระตุ้นเมื่อได้รับ17β-estradiol มีขั้นตอนดังนี้

ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสาย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ในการทดลองครั้งนี้มีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 2 ชนิด

ชนิดที่ 1 เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม FBS ปกติที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ (วิธีการเตรียมภาคผนวก ข)ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปกติ

ชนิดที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม FBS (v/v) ซึ่งผ่าน charcoal stripped ให้ได้ความเข้มข้น 10% ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ในชนิดนี้มีการใช้ charcoal stripped เพื่อดูดซับฮอร์โมนในซีรัม(Lykkesfeldt*et al.*, 2003) เนื่องจากในการเลี้ยงเซลล์ที่มาจากคนหรือสัตว์ ต้องใช้ซีรัม(serum) เป็นส่วนผสมลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในซีรัมมีสารหลายประเภทที่ช่วยในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ ในจำนวนนี้มีฮอร์โมนอยู่ด้วยโดยเฉพาะฮอร์โมนเอสโตรเจน ดังนั้นในการดูดซับฮอร์โมนนี้ออกไปจากซีรัมและนำฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนจากภายนอกที่ต้องการศึกษามาเติมลงไปเพื่อทดแทนฮอร์โมนในซีรัม ก็จะสามารถวัดการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนจากภายนอกได้ (รายละเอียดวิธีการเตรียมภาคผนวก ข)

ข. การเพาะเลี้ยงเซลล์เชื้อสาย

การเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 cm^3โดยเซลล์HeLaและ MCF-7 ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ส่วนเซลล์ MDA-MB-231 ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Leibovitz' s L-15โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 (ดูข้อก) โดยเพาะเลี้ยงในบรรยากาศและสภาพตู้อบมาตรฐานการเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไป คือ ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ37 $^{\circ}$Cความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 และ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่ทำการเพาะเลี้ยงแยก (subculture) โดยใช้ 0.1% trypsin-EDTA (ตามภาคผนวก ข) ทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวดเลี้ยงและทำการเพาะเลี้ยงแยกทุก ๆ 2-3 วัน เพื่อเตรียมเซลล์ให้มีจำนวนมากพอสำหรับการทดลอง

ค. การเตรียมเซลล์

(1) เพาะเลี้ยงแยกเซลล์เชื้อสายHeLa, MCF-7 และ MDA-MB-231(ดูข้อ ข) พร้อมทั้งตรวจนับและปรับให้มีความเข้มข้น 50,000 cells/ml ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 (ดูข้อก)

(2) นำเซลล์จากข้อ (1)ลงจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 µl โดยจะเพาะเลี้ยงเซลล์เพียง 60 หลุม ตรงกลางส่วนหลุมที่เหลือโดยรอบให้เติม PBS หลุมละ 100 µl เพื่อรักษาความชื้นของจาน

ง. การเตรียม 17β-estradiol

นำ 17β-estradiol มาทำการเตรียมความเข้มข้นเพื่อทดสอบกับเซลล์ HeLa, MCF-7 และ MDA-MB-231 มีวิธีการเตรียมดังนี้

(1) นำ 17β-estradiol1mg ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 ml ได้ความเข้มข้น 272.38 M

(2) นำสารละลายข้อ 1 มาเจือจางลำดับส่วนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น10^{-18},10^{-16}, 10^{-14}, 10^{-12} , 10^{-10} 10^{-8}, 10^{-6}และ 10^{-5} M เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

จ. การศึกษาฤทธิ์ของ 17β-estradiol ต่อเซลล์ HeLa, MCF-7 และ MDA-MB-231

(1) นำสารละลาย 17β-estradiol ที่เตรียมไว้เป็นสารละลายตั้งต้น ในข้อ งความเข้มข้นละ 4 µl มาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 396 µl รวม 400 µl (สำหรับการทดลองทำ 3 ซ้ำ)

(2) นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ คมาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารตัวอย่างในข้อ (1)หลุมละ 100 µl ความเข้มข้นละ 3 หลุม ทำให้เซลล์ได้รับสารความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 1%

(3) นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับสารไปเพาะเลี้ยงในตู้อบมาตรฐาน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(4) เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ มาเติม 10% w/v trichloroacetic acid (TCA) ที่ 4°C หลุมละ 100 µl นำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ความเข้มข้นของ TCA ที่ใช้จะมากหรือน้อย

ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเกาะพื้นของเซลล์ ถ้าเซลล์ที่ใช้หลุดง่ายให้เพิ่มความเข้มข้นของ TCA) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง พักไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือวางบนเครื่องให้ความร้อน (hot plate)

(5) นำจานที่แห้งแล้วมา เติม 0.057% w/vSRB dye ที่ละลายใน 1% v/v acetic acid หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย 1% v/v acetic acid จำนวน 4 ครั้ง พักไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือวางบนเครื่องให้ความร้อน

(6) เติม 10 mMTris base pH 10.5 ปริมาตร 200 µl ลงในแต่ละหลุม ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย (shaker) เป็นเวลา 15 นาที หรือบ่มพักไว้เป็นเวลา 30 นาที แต่ไม่เกิน 60 นาที เพื่อให้สีละลายดี จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ 510 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโคเพลท (microplate reader)

(7) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) เพื่อวิเคราะห์การออกฤทธิ์ของสารตัวอย่างต่อเซลล์ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

$$\% \text{ proliferation} = \frac{OD_{510} \text{ของแต่ละกลุ่มทดลอง} \times 100}{OD_{510} \text{ของกลุ่มควบคุม}}$$

(8) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนระหว่างความเข้มข้นและการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อได้รับสาร ในแต่ละกลุ่มของเซลล์เชื้อสาย ด้วยโปรแกรม SPSS version 17 โดยเลือกใช้การวิเคราะห์แบบ complete randomized design (CRD) หรือ one way anovaที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

3.1.2 การทดสอบเซลล์ด้วยสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่aldrinและendrinมีรายละเอียดดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่าง

ก. การเตรียม aldrin

(1) นำ aldrin1 mg เติมสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 ml ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml

(2) นำสารละลายจากข้อ 1 มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 และ 4000 nMเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

ข. การเตรียม endrin

วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียม aldrinที่ระดับความเข้มข้นเหมือนกัน

2. การศึกษาความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ MCF-7

ในขั้นตอนการศึกษานี้ได้ประยุกต์และดัดแปลงกระบวนการโดยรวมจากที่ระบุไว้ในงานวิจัยของ Arao*et al.*(2007),Wichai*et al.*(2008), Watson and Yager (2007), Gadd*et al.* (2009) และ Jugan*et al.* (2009)มีขั้นตอนดังนี้

(1) เพาะเลี้ยงแยกเซลล์เชื้อสาย พร้อมทั้งตรวจนับและปรับให้มีความเข้มข้น 5,000 cell/ml หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 µl โดยจะเพาะเลี้ยงเซลล์เพียง 60 หลุมตรงกลางส่วนหลุมที่อยู่โดยรอบจานเลี้ยงให้เติม PBS หลุมละ 100 µl เพื่อรักษาความชื้นจาน

(2) นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.2 ข้อ 1 ความเข้มข้นละ 4 µlผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 396 µl รวม 400 µl (สำหรับการทดลอง 3 ซ้ำ)

(3) นำจานเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารในข้อ 2 หลุมละ 100 µl ความเข้มข้นละ3 หลุม ทำให้เซลล์ได้รับสารความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% ของสารละลายตั้งต้น และมีชุดควบคุม 1 ชุด คือ ชุดควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม 10% (v/v) FBS ที่ผ่าน charcoal stripped และ 1% (v/v) ของตัวทำละลายในแต่ละตัวอย่าง (solvent control)

(4) นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับสารไปเพาะเลี้ยงในตู้อบสภาวะมาตรฐาน ในขั้นตอนต่อไปนี้ทำเช่นเดียวกับหัวข้อ3.1.1ข้อ จ-4ถึง จ-8

3.1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

เพื่อยืนยันว่าการตอบสนองของเซลล์ต่อสารมาตรฐานในข้อ 3.1.2 เป็นการแสดงฤทธิ์ผ่านวิถีเอสโตรเจนหรือไม่ มีขั้นตอนดังนี้

ก. การทดสอบตัวอย่างต่อเซลล์เพื่อสกัด RNA

(1) เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน $35x10^4$ cells/mlลงในขวดเลี้ยงขนาด 75 cm^2เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ลงเกาะกับพื้นของจานเลี้ยง

(2) เมื่อเซลล์ลงเกาะบนจานเลี้ยงแล้ว ให้ทำการดูดอาหารเก่าทิ้งแล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชุดที่ 2 ดูข้อ 3.1.1 ข้อ กแล้วนำมาผสมกับสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากที่สุด (ดูตาราง 4.1) ลงในแต่ละขวดเลี้ยงให้ได้ปริมาตรสุดท้ายของแต่ละขวดเลี้ยงเท่ากับ 7,000 µl นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบสภาวะมาตรฐาน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัด RNA

ข. การสกัดและการตรวจสอบคุณภาพ total RNA

(1) นำเซลล์ในข้อ กมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 rpm เป็นเวลา 10 นาที

(2) เทของเหลวทิ้งเหลือตะกอน เติม TE buffer 2 ml ดูดเป่าผสมกัน

(3) นำสารละลายทั้งหมดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้งเหลือตะกอน แล้วเติม TE buffer 2 ml ลงไปดูดเป่าให้ผสมกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมอีกครั้งหนึ่งนำมาเติม Trizol®reagent 400 µl ที่เย็น แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มี chloroform 200 µl อยู่ก่อนแล้ว และนำไป vortex เป็นเวลา 10-15 วินาที จากนั้นจึงตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อสกัดโปรตีนออกจาก RNA

(4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15นาทีดูดสารส่วนใสชั้นบนซึ่งมี RNA อยู่ ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มี isopropanol 500 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

(5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 นาทีจะได้ตะกอน RNA จากนั้นเติม ethanol 95% ที่เย็นจัด 1,000 µl ลงไปในหลอดเพื่อล้าง RNA อีกครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที

(6) เทสารชั้นบนทิ้ง แล้วปล่อยให้แห้ง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม DEPC-treated water (ภาคผนวก ข) ลงไป 10 µl ผสมให้เข้ากัน

(7) เก็บ total RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

(8) แบ่ง RNA ที่สกัดได้มา 2 µl นำไปตรวจสอบบน 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer (ภาคผนวก ข) โดยใช้กำลังไฟ 75 watt เป็นเวลา 45 นาที

(9) ย้อมเจลด้วย 10 mg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 10 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบและถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV-transilluminatorโดยใช้โปรแกรม Quantity One V. 4.4.1

(10) นำ RNA 8 µl นำไปสังเคราะห์ให้เป็น cDNAต่อไป (ดูข้อ ค)

หมายเหตุทุกขั้นตอนต้องทำในน้ำแข็ง

ค. การสังเคราะห์ cDNA

นำ RNA ที่สกัดได้จากข้อ ข มาสังเคราะห์ cDNAโดยใช้เอนไซม์ M-MuLV® Revertid reverse transcriptase ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาใน PCR tube หลอดที่ 1 ดังตาราง 3 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°Cเป็นเวลา 5 นาที

(2) เมื่อครบ 5 นาทีแล้วนำ PCR tube หลอดที่ 1 ออกมาแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที แล้วเตรียมส่วนผสมดังตาราง 4 ลงไป PCR tube หลอดที่ 2

(2) นำสารละลายใน PCR tube หลอดที่ 1 ผสมกับหลอดที่ 2 แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 40°Cเป็นเวลา 45 นาทีที่

อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 5 นาทีและเก็บพักไว้ที่ 4 °C

(4) แบ่ง cDNAบางส่วนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) และส่วนที่เหลือก็เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

ตาราง 3.1 ส่วนผสมในการสังเคราะห์ cDNAใน PCRtube หลอดที่ 1

สาร	ปริมาตร (µl)
Template RNA	8.0
10 mMdNTP	1.0
50 µM oligodT	1.0
Total	10.0

ตาราง 3.2 ส่วนผสมในการสังเคราะห์ cDNAใน PCR tube หลอดที่ 2

สาร	ปริมาตร (µl)
10X RT buffer	2.0
RT enzyme mix	2.0
dH_2O	6.0
Total	10.0

ง. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ cDNA

เจือจางสารละลาย cDNAจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาณ โดยผสมน้ำกลั่น 998 µl กับสารละลาย cDNAปริมาตร 2 µl ให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งจะทำการวัดค่าความยาวคลื่น 2 ช่วง คือ 260 nm และ 280 nm โดย OD_{260} เป็นการวัดปริมาณ nucleic acid และ OD_{280} เป็นการวัดปริมาณโปรตีน ซึ่งอัตราส่วนของ OD_{260}/ OD_{280} จะบอกถึงความบริสุทธิ์ของ nucleic acid โดยปกติจะมีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0 หน่วยจากนั้นนำค่า OD_{260} มาคำนวณหาปริมาณของ cDNAโดยใช้สูตรดังนี้

สูตร ความเข้มข้นของ cDNA(ng/µl) = ค่า OD_{260} x 50 x dilution factor

โดย - ค่า 50 หมายถึง ที่ค่า OD_{260} เท่ากับ 1 จะมีปริมาณ DNA 50 ng/µl

- dilution factor หมายถึง ค่าการเจือจางที่นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง สำหรับในการทดลองนี้ ค่า dilution factor = 250 (เซลล์เชื้อสาย MCF-7)

จ. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสาย

การตรวจสอบนี้ใช้เทคนิค semi-quantitative reverse transcriptase PCR โดยการนำ cDNA ของเซลล์ MCF-7มาปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 100 ng/µl ก่อนนำไปศึกษาระดับการแสดงออกของยีน 5 ชนิด ได้แก่*ERα,Akt,PI3K, TFRC* และ*SULT1E1* โดยจะใช้ยีน *β-actin* เป็นยีนควบคุมหรือ housekeeping gene ซึ่งในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคนี้ จะต้องเตรียมสารละลายต่าง ๆ ดังตาราง 3.3

ตาราง 3.3 ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR

สาร	ปริมาตร (µl)
2x PCR master mix	5.0
10 mM reverse primer	0.5
10 mM forward primer	0.5
Template DNA	2.0
dH_2O	2.0
Total	10.0

นำสารทั้งหมดผสมกันลงใน PCR tube ขนาด 200 µl จากนั้นจึงเริ่มทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนให้เหมาะสมดังแสดงใน ตาราง 3.4-3.5จากนั้นจึงเก็บ PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน

ตาราง 3.4 ขั้นตอนและอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR

(ที่มา:คู่มือวิธีการใช้ iNtRON'sMaxime PCR Premix Kit (iNtRON biotechnology, Korea))

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
- ขั้นตอนที่ 1	95	5 นาที
- ขั้นตอนที่ 2 (35 รอบ)		
Denaturation	94	30 วินาที
Annealing	อุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์แต่ละคู่ (ตาราง 3.5)	30 วินาที
Extension	72	30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 3	72	10 นาที

ตาราง 3.5 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)	PCR product (bp)
β-actin	NM_001001	Fw-ATGGATGATGATTATCGCCGC-3' Rw-ACCATCACGCCCTGGTGCCTG-5'	54	293
ERα	NM_000125	Fw- GTGGGAATGAAAGGTGG Rw- TCCAGAGACTTCAGGGTGCT	57.07	248
Akt	NM_001001	Fw- TAGGCCCAGTCGCCCGCAC Rw- TCCGTGGCCCCCAGAGACAG	66.19	119
PI3K	NM_001160	Fw- GCAGACCAGGCAGGCTGACG Rw- CCTGCTCGGCCCTGCAACAA	66	218
TFRC	NM_003234	Fw- GTGTGAGAGACTGGCAGGAA Rw- GCTGGTGAAGTCTGTGCTGT	59.85	261
SUT1E1	NM_005420	Fw- ATGAATTCTGAACTTGACTA Rw- TTAGATCTCAGTTCGAAACTTC	57.07	119

ฉ. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน

(1) นำ DNA หรือ PCR product มา 2 µl ผสมกับ 6X loading dye 1 µl แล้วนำไปถ่ายลงบน 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer เป็นเวลา 45 นาที ด้วยกำลังไฟ 75 watt พร้อมกันนั้นทำการถ่าย ladder 1,000 bp DNA ลงไปด้วย

(2) นำเจลที่ได้มาใส่ใน 10 mg/ml ethidium bromide แล้วดูภายใต้แสง UV วัดความเข้มหรือความสว่างของแถบ DNA หรือ PCR product โดยใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (ภาคผนวก ค) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราส่วนระดับการแสดงออกของยีนโดยเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน *β-actin* และในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบด้วย DMSO โดยเรียกกระบวนการนี้ว่า normalization (ภาคผนวก ค)

ช. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการของDunnett t โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Complete Randomized Design (CRD) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย volume ของแต่ละยีนด้วยวิธี one – way analysis of variance (ANOVA) จากนั้นจึงจัดกลุ่มข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ย ตามวิธีการของ Tukeyที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ $p \leq 0.05$ ในโปรแกรม SPSS version 17 โดยผลจากการวิเคราะห์จะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์แต่ละชนิด ซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวก ง

3.2 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ

ในการตรวจสอบฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาตินี้ได้เก็บตัวอย่างน้ำก่อนที่จะมีการปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาในลำดับขั้นต่อไปในอนาคต มีรายละเอียดขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การเก็บและการเตรียมตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่

การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดมีขั้นตอนดังนี้

ก. สำรวจจุดที่จะทำการเก็บตัวอย่าง

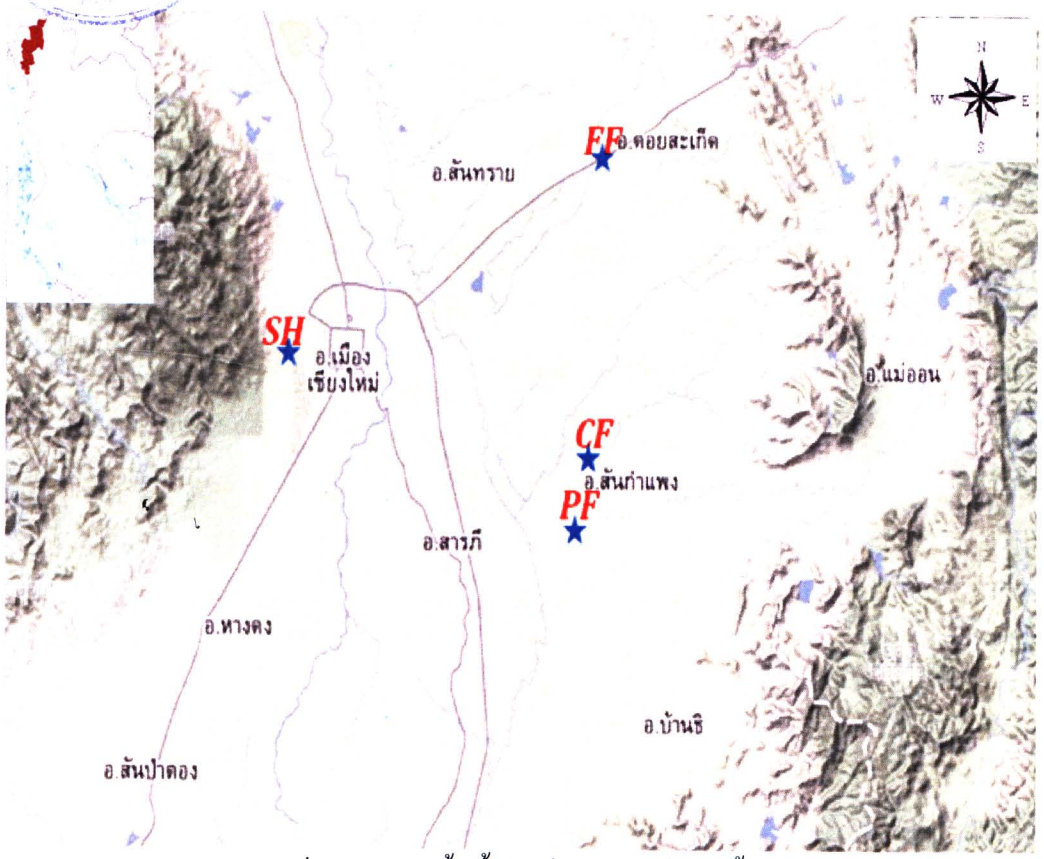
จากการสำรวจพื้นที่ที่มีฟาร์มปศุสัตว์ในจังหวัดเชียงใหม่และน้ำเสียบ่อบำบัดพบว่า อำเภอดอยสะเกร็ด อำเภอสันทราย มีที่ตั้งของฟาร์มสุกร ฟาร์มวัว ฟาร์มกบ และอำเภอเมืองพบที่ตั้งบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล (ดังภาพ 3.1) โดยแบ่งเก็บตัวอย่างออกเป็น 4 ตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มสุกร (pig farm อักษรย่อ PF) ที่เก็บมาจากท่อระบายน้ำทิ้งของฟาร์มที่ตั้งในอำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ มีการปล่อยน้ำทิ้งสู่พื้นที่เกษตรและแหล่งน้ำธรรมชาติทำให้เกิดการปนเปื้อน

ตัวอย่างที่ 2 ตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มวัว (cow farm อักษรย่อCF) ที่เก็บมาจากท่อระบายน้ำทิ้งของฟาร์มที่ตั้งอยู่ในอำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ มีการปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

ตัวอย่างที่ 3 ตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มกบ (frog farm อักษรย่อFF) ที่เก็บมาจากท่อระบายน้ำทิ้งของฟาร์มที่ตั้งอยู่ในอำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ มีการเลี้ยงกบในบ่อและมีการปล่อยน้ำทิ้งลงสู่พื้นที่เกษตร

ตัวอย่างที่ 4 ตัวอย่างน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ (hospital treatment plant อักษรย่อ SH) ที่เก็บมาจากบ่อบำบัดก่อนปล่อยออกสู่ภายนอกตั้งอยู่ในอำเภอเมืองลักษณะของบ่อบำบัดน้ำเสียเป็นบ่อบำบัดที่มีมาตรฐานมีการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีตามมาตรฐานของกรมควบคุมมลพิษ แต่ยังไม่มีค่ามาตรฐานที่จะตรวจสอบเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในบ่อบำบัดน้ำเสีย



ภาพ 3.1 แสดงบริเวณจุดเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ (แผนที่ดัดแปลงมาจากไฟล์ภาพที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ภูมิภาคเทคโนโลยีอากาศและภูมิสารสนเทศภาคเหนือคณะสังคมศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่มาตราส่วนอ้างอิงของระวางแผนที่สามารถสืบค้นจากหน่วยงานนี้ได้)

ข. วิธีเก็บตัวอย่าง

ได้ทำการเก็บตัวอย่างตามจุดเก็บที่กำหนดไว้ ดังภาพ 3.1 โดยเก็บตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1เก็บใส่ขวดสีชา

เพื่อใช้เป็นตัวอย่างทดสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเต้านม MCF-7ซึ่งใช้เป็นโมเดลในการทดลองเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ-20 °C

ส่วนที่ 2 เก็บใส่ขวดโพลีเอทธิลีน

เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำทางด้านเคมีบางประการดังนี้

(1) วัดอุณหภูมิของน้ำ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

(2) วัดค่าการนำไฟฟ้าโดยใช้ conductivity meter

(3) วัด pH ของน้ำโดยใช้ pH meter

(4) วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen ; DO)โดยวิธี Azide modification method (APHA, 1992)

(5) วัดปริมาณความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (Biochemical Oxygen Demand ; BOD_5)โดยวิธี Azide modification method (APHA, 1992)

(6) วัดปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจน (NO_3-N)โดยวิธี Phenoldisulphonicmethod

(7) วัดปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_3-N)โดยวิธี Nesslerization method

(8) วัดปริมาณออร์โธฟอสเฟต (PO_4-P)โดยวิธี Ascorbic method

วิธีการวัดคุณภาพน้ำโดยละเอียดในภาคผนวก ก

ค. การเตรียมตัวอย่าง

ได้แก่ น้ำทิ้งฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบ และ น้ำเสียจากบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ ดูข้อ 3.2.1มาทำการเตรียมความเข้มข้นโดยมีวิธีการเตรียม ดังนี้

(1) นำตัวอย่างน้ำมากรองด้วย syringe filter ในตู้ปลอดเชื้อ

(2) นำตัวอย่างน้ำ(ในข้อ 1)มา 10 µl เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 990 µlได้ความเข้มข้น 10 µl/ml

(3) เจือจางตัวอย่างน้ำด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชุดที่ 2 (ดูข้อ 3.1.1ข้อ ก) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-4} , 10^{-2}และ10 µl /ml เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ MCF-7

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2ข้อ 2โดยใช้ชุดควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม 10% (v/v) FBS ที่ผ่าน charcoal stripped และ 1% (v/v) ของตัวทำละลายในแต่ละตัวอย่าง (solvent control)

3.2.3การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.1.3ข้อ ก-ช

3.3 การตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด

ได้แก่ สมุนไพรบำรุงกำลัง (analeptic herbs ; AH) ,สารสกัดกวาวเครือขาว *Puerariamirifica* (body shape improvement herb ; BH),น้ำใบบัวบก*Centellaasiatica Urban*(tiger herbal; TH) และ น้ำมะพร้าวอ่อน*Cocosnicifera* L. (young coconut juice; CJ)มีขั้นตอนดังนี้

3.3.1การเตรียมตัวอย่าง

ก. สมุนไพรบำรุงกำลัง(AH)

มีวิธีการเตรียมดังนี้

(1) นำสมุนไพรบำรุงกำลังที่ซื้อมาจากตลาดมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากแห้งและ บดละเอียดด้วยเครื่องบด

(2) นำส่วนของสมุนไพรที่ตากแห้งแล้วมาแช่ด้วยตัวทำละลายเอธานอลเป็นเวลา 3 วัน

(3) ทำการกรองแยกกากและสารละลายที่ได้จากการแช่ออกจากกัน นำส่วนที่เป็นสารละลายเก็บไว้รอการสกัด ส่วนกากของสมุนไพรให้นำไปแช่ในเอธานอลอีกครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายที่ได้มารวมกัน หลังจากนั้นนำไประเหยจะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น

(4) นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) และทำให้แห้งด้วยปั๊มสุญญากาศ(vacuum pump) จะได้สารละลายที่เข้มข้น

(5) นำสารละลายในข้อ 4มา 10 µl เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชุดที่ 2(ดูข้อ 3.1.1ข้อ ก) 990 µl ได้ความเข้มข้น 10 µl/ml

(6) นำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชุดที่ 2 (ดูข้อ 3.1.1ข้อ ก)ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-14}, 10^{-12}, 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-4}, 10^{-2}และ 10 µl/ml เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

ข. สารสกัดกวาวเครือขาว (BH)

กวาวเครือขาวที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. กนกพร แสนเพรช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากกวาวเครือขาวพอสังเขปดังนี้

(1) นำกวาวเครือขาวที่บดละเอียดแล้วมาแช่ด้วยตัวทำละลายเอธานอล เป็นเวลา 3 วัน

(2) แยกกากและสารละลายออกจากัน นำส่วนที่เป็นสารละลายไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) และทำให้แห้งด้วยปั๊มสุญญากาศ (high vacuum pump) ได้สารสกัดแบบหยาบ (crude)

(3) นำสารสกัดแบบหยาบ (ข้อ 2)มา 1 mg เติมสารละลาย DMSO 1 ml ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml

(4) เจือจางสารสกัดกาวเครือขาวด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชุดที่ 2 (ดูข้อ 3.1.1ข้อ ก) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-8},10^{-6},10^{-4},10^{-2},10^{-1},$1x10^{3}$,$2x10^{3}$และ $4x10^{3}$µg/ml เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

ค. น้ำใบบัวบก (TH)

มีวิธีการเตรียมดังนี้

(1) นำส่วนใบของใบบัวบกมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากแห้งและบดให้ละเอียดโดยเครื่องบด

(2) นำส่วนของสมุนไพรที่ตากแห้งแล้วมาแช่ด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น เป็นเวลา 3 วัน

(3) ทำการกรองแยกกากและสารละลายที่ได้จากการแช่ออกจากกัน

(4) นำน้ำใบบัวบกมากรองด้วย syringe filter ในตู้ปลอดเชื้อ

(5) นำน้ำใบบัวบก(ในข้อ 3)10 µlเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชุดที่ 2 (ดูข้อ 3.1.1ข้อ ก)มา 990 µl ได้ความเข้มข้น 10 µl/ml

(6) เจือจางน้ำใบบัวบกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชุดที่ 2 (ดูข้อ3.1.1 ข้อ ก) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-14}, 10^{-12}, 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-4}, 10^{-2} และ 10 µl/ml เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

ง. น้ำมะพร้าวอ่อน(CJ)

มีวิธีการเตรียมดังนี้

(1) นำน้ำมะพร้าวมากรองด้วย syringe filter ในตู้ปลอดเชื้อ

(2) นำน้ำมะพร้าว ในข้อ 1 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 990µl ได้ความเข้มข้น 10 µl/ml

(3) เจือจางน้ำมะพร้าวในข้อ 2 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชุดที่ 2 (ดูข้อ 3.1.1 ข้อ ก) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-14}, 10^{-12}, 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-4}, 10^{-2}และ 10 µl/ml เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

3.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ MCF-7

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 ข้อ 2

3.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3ข้อ ก-ช