บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 อุปกรณ์ที่ปลอดเชื้อ (sterile)

1. PCR tube
2. Petri dish
3. Cover slip
4. Pipette boy
5. Pasteur pipette
7. Centrifuge tubes
8. 8-strip PCR tube
9. ปากคีบปลายแหลม
10. cryotubes (Nunc, Denmark)
11. อุปกรณ์ช่วยไปเปต (pipette aid)
12. Tips ขนาด 50, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
13. Volumetric pipette ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
14. Centrifuge tube ขนาด 10, 20 และ 50 มิลลิลิตร
15. Micro centrifuge tube ขนาด 0.5 และ 2 มิลลิลิตร
16. ขวด Duran ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
17. Autopipette ขนาด 2, 10, 20, 200 และ 1000 มิลลิลิตร
18. Syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)
19. จานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (96 well plate) (Nunc, Denmark)
19. จานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (24 well plate) (Nunc, Denmark)
20. จานเพาะเลี้ยงขนาด 60x15 มิลลิเมตร (Nunclon TM Δ serface, Denmark)
21. กระจกปิดสไลด์ (cover slips) วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร

22. ขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาดพื้นที่เพาะเลี้ยง 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร

3.1.2 อุปกรณ์ที่ไม่ปลอดเชื้อ (nonsterile)

1. ไฟแช็ค
2. บีกเกอร์
3. ถุงมือยาง
4. พาราฟิล์ม
5. Waste bottle
6. กระจกสไลด์
7. กระดาษชำระ
8. ถุงมือพลาสติก
9. Centrifuge rack
10. อลูมิเนียมฟลอย
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. เครื่องปั๊มสูญญากาศ
13. Haemocytometer และ cover slip
14. Stage micrometer และ ocular micrometer

3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่งสารเคมี
2. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
3. เครื่องไมโครเวฟ (Sharp, Japan)
4. ตู้ทำงานปลอดเชื้อ (Dwyer, USA)
5. เครื่องวัด pH (Toledo, Switzerland)
6. เครื่อง vortex (Shelton,USA รุ่น VSM-3)
7. Shaker ควบคุมอุณหภูมิ (Shellab, Canada)
8. Thermal cycler (Biorad, USA รุ่น MyCycler)
9. Thermal cycler (Biorad, USA รุ่น MJmini)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, UK รุ่น Mikro 200)

11. Electrophoresis สำหรับเจล agarose (Cosmobio, Japan)

12. ถังไนโตรเจนเหลว (Biogenics, USA รุ่น MVE Lab 30)

13. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Songserm inter, Thailand)

14. เครื่องถ่ายภาพใต้ UV (UV transilluminator) (Biorad, USA)

15. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, Germany)

16. หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) (Hirayama, Japan รุ่น HiclaveHV-110)

17. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (UV mini-1240)

18. เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (Elga purelab option, UK รุ่น 03007BPM1)

19. ตู้อบอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany รุ่น modell 600)

20. ตู้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope) (Olympus, Japan รุ่น BH-2)

21. ตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) (SLshellab,Canada)

22. แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Thermo, China รุ่น 8600 Electron corporation Series)

23. กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Ziess, USA รุ่น Axioskop 2 plus, model: CCD-1300 DS)

24. กล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง (inverted microscope) (Nikon, Japan Type 108รุ่น ECLIPSE TE 300)

25. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Hettich Zentrifugen, UK รุ่น Universal 320R) MJ Research DNA Engine Opticon®2 (MJ Research PTC-200 Thermal cycler, USA)

26. เครื่อง Microplate Reader (Dynex)

27. เครื่อง real-time PCR รุ่น MyiQ5 (BioRAD, USA)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมี

1. Distill water

2. Deionized distill water (Lab-scan, Ireland)

3. Tris (Vivantis, USA)

4. dNTP (Vivantis, USA)

5. KCl (Merck, Germany)

6. HCl (Merck, Germany)

7. NaCl (Merck, Germany)

8. Glutamine (Gibco, USA)

9. Agarose (Vivantis, USA)

11. Trypan blue (Gibco, USA)

13. Gentamycin (Gibco, USA)

14. NaOH (Lab-scan, Ireland)

15. Ethanol (Lab-scan, Ireland)

16. KH_2PO_4 (Merck, Germany)

17. Methanol (Lab-scan, Ireland)

18. Na_2HPO_4 (Lab-scan, Ireland)

19. Oligo dT_{12} (Fermentas, USA)

20. PBS (phosphate buffer saline)

21. Loading buffer (Fermentas, USA)

21. Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) (Vivantis, USA)

22. Phenol (Amresco, USA)

23. Chloroform (Lab-scan, Ireland)

22. Glacial acetic acid (Merck, Germany)

23. Reverse primer (Bio basic Inc., USA)

24. Forward primer (Bio basic Inc., USA)

25. Penicillin – Streptomycin (Gibco, USA)

26. Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA)

26. para-nitrophenol phosphate (pNPP) (Amresco, USA)

26. Trizol™ reagent (Gibco, USA)

27. Ethidium bromide solution (Invitrogen, USA)

28. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany)

30. Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA)

31. Ethylenedlaminetetra-acetic acid (EDTA) (Lab-scan, Ireland)

32. Gene Ruler™ 100 base pair DNA ladder plus (Fermentas, USA)

33. X-treamHP transfection reagent (Roche, USA)

3.2.2 เอนไซม์

1. Trypsin (Gibco, USA)
2. RNase (Fermentas, USA)
3. Dnase I (Fermentas, USA)
4. *Eco*RI restriction enzyme (Fermentas, USA)
5. *Bgl*II restriction enzyme (Fermentas, USA)
6. *Nru*I restriction enzyme (Fermentas, USA)
7. *Kpn*I restriction enzyme (Fermentas, USA)
8. *Hind*III restriction enzyme (Fermentas, USA)
9. T4 DNA ligase (Fermentas, USA)
4. *Taq* DNA polymerase (RBCbioscience, Taiwan)
5. *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)
6. *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, USA)
7. RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentase, USA)
8. Proteinase K (Invitrogen, USA)

3.2.3 ชุดทดลอง

1. Wizard®*Plus* SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, USA)
2. Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega, USA)
3. NucleoBond®Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, Germany)
4. Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, USA)

3.3 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การโคลนดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน matrix metalloproteinase 3 (MMP-3 promoter)

1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของช่วงการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter) ถูกนำมาจากฐานข้อมูล human genome project (NT_033899) เพื่อใช้ออกแบบ primer ด้วยโปรแกรม primerBLAST ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งได้ลำดับนิวคลีโทด์ของไพรเมอร์ ดังตาราง 3.1 ซึ่งผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์นี้จะมีขนาด 2,127 bp

ตาราง 3.1 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-->3')	T_m(°C)
MMP3 promoter	Fw: GCC ACC ACT CTG TTC TCC TTG TCC T	67.9
	Rv: TTA AGC CCC AGT GCT GCT ACT GCT A	66.2

Fw คือ forward primer และ Rv คือ reverse primer

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยง human lung fibroblast

เก็บเซลล์ human lung fibroblast (ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์วีระ วงศ์คำ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเซลล์เพาะเลี้ยง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ที่ได้จากการ trypsinization ในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง จากนั้นเติม TE buffer 500 µl 10% SDS 50 µl และ 20 mg/ml proteinase K 2 µl บ่มไว้ที่ 65°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วเติมด้วย phenol: chloroform อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 500 µl กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารละลายผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 1 เท่าลงไปในหลอดใหม่ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 10 นาที

ดูดสารละลายใสด้านบนใส่หลอดใหม่เติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายที่ดูดมาได้ และ 5M sodium acetate, pH 6.5 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ดูดมา กลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วบ่มทิ้งไว้ที่ -20°C ข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 15 นาที จะพบตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด เทสารละลายทิ้ง เติม 70% ethanol 1 ml กลับหลอดไปมาเพื่อล้างตะกอนให้สะอาดแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้งนำตะกอนที่ไประเหยเอาสารละลายออก เมื่อตะกอนแห้งแล้วให้เติมด้วย deionized distill water หรือ TE buffer ปริมาตร 30 µl เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20°C เพื่อรอตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอต่อไป

1.3 การวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

1. การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การวัดปริมาณดีเอ็นเอจะใช้การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง ultraviolet คือ 260 nm ซึ่งเป็นช่วงที่ไนโตรจีนัสเบสในดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยค่าที่วัดได้ 1 OD (optical density) ของดีเอ็นเอนั้นจะมีค่าเท่ากับ 50 µg/ml นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจาง 100 เท่า แล้วนำไปวัดค่า OD จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอดังนี้

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = OD_{260} x 50 µg/ml x dilution factor

หมายเหตุ: ถ้าเจือจางสารละลายดีเอ็น 100 เท่า ค่า dilution factor เท่ากับ 100

2. การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

เพื่อตรวจสอบว่าสารละลายดีเอ็นเอว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือสารอื่นมาหรือไม่ซึ่งจะใช้หลักการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งเป็นช่วงที่ใช้วัดปริมาณของโปรตีนแล้วนำมาหาอัตราส่วนของค่า OD ที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 (A_{260}/A_{280}) ค่าควรจะอยู่ในช่วง 2.0-1.8 ถือว่าอยู่ในช่วงที่ดีเอ็นเอมีคุณภาพดี และนอกจากนี้ต้องตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อดูว่าดีเอ็นมีการแตกหัก (smear) หรือไม่ โดยนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบด้วย 1% agarose ในสารละลาย 1X TAE buffer แล้วนำไปย้อมด้วยสาร ethidium bromide (EtBr) และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation (BioRad) ถ่ายภาพเก็บไว้ นำดีเอ็นเอไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 ng/µl และเก็บรักษาไว้ที่ -20°C

1.4 การหา annealing temperature ของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)

เตรียมสารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังตาราง 3.2 โดยใช้ genomic DNA ของ human lung fibroblast เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และในโปรแกรมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้อุณหภูมิในช่วง annealing แตกต่างกัน gradient โดยกำหนดช่วงอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 63-53°C

ตาราง 3.2 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) ในส่วนการควบคุมการแสดงของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20	-	16.3
10x Buffer (KCl)	1x	2.5
25mM $MgCl_2$	2mM	2
2.5mM dNTP	0.2mM	2
10 µM Forward (Fw)	0.2 µM	0.5
10 µM Reverse (Rv)	0.2 µM	0.5
5 U/µl *Taq* DNA polymerase	1 U	0.2
100 ng/µl DNA	200 ng	2
Total		25

1.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 จาก genomic DNA (gDNA) ของ human lung fibroblast ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยมีส่วนประกอบของสารเคมีดังตาราง 3.2 และใช้โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงการควบคุมการแสดงของยีน MMP-3 ดังตาราง 3.3 แล้วนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis และเทียบขนาดของผลผลิตที่ได้ว่าตรงกับขนาดของดีเอ็นเอที่ออกแบบไพรเมอร์โดยวัดขนาดของผลผลิตที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดของดีเอ็นเอ

ตาราง 3.3 โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงการควบคุมการแสดงของยีน MMP-3 ด้วยเครื่อง thermocycle

ขั้นตอนของปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	นาที	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	94	5.00	1
denaturation	94	0.20	
annealing	63	0.30	
extension	72	1.30	38
final extension	72	7.00	1

การทดลองที่ 2 การสร้างเวคเตอร์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3

2.1 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 กับ TA cloning vector (ligation)

นำดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ได้จาก PCR ซึ่งที่ปลายของผลผลิต PCR ที่เกิดจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะมีการเติม A-overhang ที่ปลาย 3' ดีเอ็นเอ ซึ่งจากกิจกรรมของเอนไซม์นี้จึงนำผลผลิต PCR มาเชื่อมต่อเวคเตอร์ TA cloning vector (RBC, Taiwan) ที่มีปลาย 3' เปิดเป็น T-overhang โดยในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยสารเคมีดังตาราง 3.4 แล้วนำสารที่ผสมนี้บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และ 70°C 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase

ตาราง 3.4 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการเชื่อมต่อดีเอ็นเอระหว่างผลผลิต PCR ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter) กับ TA cloning vector

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20	-	2
10x T_4 DNA ligase buffer	1x	1
PEG4000	-	1
PCR product	-	3
500 ng/µl TA vector	1 µg	2
5 unit/µl T_4 DNA ligase	5 unit	1
Total		10

2.2 การส่งถ่ายดีเอ็นเอเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α (Transformation)

นำสารละลายที่ได้จาก ligation ในข้อ 2.1 ปริมาตร 2 µl ผสมกับเซลล์ competent *E. coli* DH5α (RBC, Taiwan) ปริมาตร 20 µl และ vortex ประมาณ 1 วินาที แล้วบ่มบนน้ำแข็งนาน 8 นาที จากนั้นนำไป spread บน LB agar ที่มี 100 µg/ml ampicillin 30 µl 0.1 M IPTG และ 50 µl 50 mg/ml X-gal จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 16-18 ชั่วโมง

2.3 การตรวจสอบโคโลนีแบคทีเรียที่ต้องการด้วยวิธี colony PCR

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ถูกส่งถ่ายเวคเตอร์ในข้อ 2.2 โคโลนีแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้จะเป็นแบคทีเรียที่ได้รับเวคเตอร์เท่านั้นเนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนั้นมี ampicilin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนี้ ซึ่งใน TA cloning vector จะมียีน ampicilin resistant อยู่ ดังนั้นแบคทีเรียที่ได้รับเวคเตอร์นี้จึงสามารถเจริญบนอาหารที่มี ampicillinได้ และโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารนี้จะมีโคโลนีอยู่ 2 แบบ คือ โคโลนีสีขาว (white colony) และโคโลนีสีน้ำเงิน (blue colony) ซึ่งโคโลนีแบคทีเรียสีน้ำเงินนั้นเกิดจากการส่ง TA cloning vector ซึ่งจะมียีน β-galactosidase โดยยีนนี้จะถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยสาร IPTG และโปรตีนที่สร้างจากยีนนี้สามารถย่อยสลาย X-gal ซึ่งจะได้สารสีน้ำเงิน ดังนั้นจึงทำให้แบคทีเรียนั้นมีโคโลนีเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับเวคเตอร์ที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกในช่วงของยีน β-galactosidase จึงทำให้เอนไซม์ทำงานได้ปกติ แต่ในกรณีที่เวคเตอร์มีการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอจะทำให้เอนไซม์ β-galactosidase ที่สร้างจากยีนนี้ทำงานผิดปกติ เพราะตำแหน่งที่ชิ้นดีเอ็นเอเข้าไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์นั้นจะอยู่ในช่วงของยีน β-galactosidase ดังนั้นจึงทำให้การสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ผิดปกติ จึงไม่สามารถย่อย X-gal ได้ โคโลนีของแบคทีเรียจึงเป็นสีขาว ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวเท่านั้นมาทำ colony PCR เพื่อพิสูจน์ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่เข้าไปแทรกอยู่ระหว่าง TA cloning vector เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ โดยใช้ universal primer M13 (M13-F: GTT TTC CCA GTC ACG AC และ M13-R: TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C) ซึ่งตำแหน่งของไพรเมอร์นี้จะอยู่บนเวคเตอร์และอยู่ระหว่างตำแหน่งที่จะมีชิ้นดีเอ็นเอเข้าไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ ย้ายโคโลนีจากจานเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้รับการส่งถ่ายเวคเตอร์ละลายในสารละลายที่เตรียมไว้สำหรับการทำ PCR ดังตาราง 3.5 โดยใช้โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR ดังตาราง 3.6 และย้ายโคโลนีด้วยกันลงบน LB agar ที่มี 100 μg/ml ampicillin เพื่อใช้เป็น replica plate สำหรับโคโลนีที่ตรวจสอบ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ใช้เวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง และนำผลผลิต PCR ที่ได้ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

ตาราง 3.5 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการทำ colony PCR เพื่อคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวคเตอร์ที่ต้องการด้วย M13 universal primer

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20	-	19.3
10x Buffer+$MgCl_2$	1x	2.5
2.5mM dNTP	0.2mM	2
10 µM Fw	0.2 µM	0.5
10 µM Rv	0.2 µM	0.5
5 U/µl *Taq* DNA polymerase	1 U	0.2
Total		25

ตาราง 3.6 โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิของการทำ colony PCR ด้วย M13 universal primer

ขั้นตอนของปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	นาที	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	5.00	1
Denaturation	94	0.20	
Annealing	60	0.30	
Extension	72	1.30	38
final extension	72	7.00	1

2.4 การสกัดเวคเตอร์แบบ midi-prep ด้วยชุดสกัดเวคเตอร์สำเร็จรูป Wizard®*Plus* SV Minipreps DNA Purification Systems

เมื่อได้โคโลนีที่ต้องการแล้วนำโคโลนีนั้นมาเลี้ยงใน LB broth ที่มี 100 µg/ml ampicillin ปริมาตร 5 ml นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดตามขั้นตอนของการสกัดเวคเตอร์ของชุดสกัดเวคเตอร์ Wizard®*Plus* SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, USA) เรียก เวคเตอร์ลูกผสมที่ได้นี้ว่า **pMMP3-TA**

2.5 การตรวจสอบทิศทางการเชื่อมของชิ้นดีเอ็นควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ใน TA cloning vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงของยีน MMP-3 ใน pMMP3-TA เพื่อที่จะใช้ในการเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมในการนำมาใช้ตัดและเชื่อมต่อกับ pSEAP-control ซึ่งเป็น reporter vector ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบทิศทาง คือ *Eco*RI โดยมีส่วนประกอบสารเคมีดังตาราง 3.7 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 16-18 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ตาราง 3.7 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20	-	7.5
10x *Eco*RI buffer	1x	1
vector	-	1
10 unit/µl *Eco*RI	5 unit	0.5
total		10

2.6 การตัดชิ้นดีเอ็นเอควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 จาก pMMP3-TA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการตรวจทิศทางการเรียงตัวของดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออก MMP-3 จากข้อ 2.5 ทำให้ทราบว่าทิศทางการเรียงตัวของดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออก MMP-3 ใน pMMP3-TA นั้นมีทิศทางแบบปกติ ดังนั้นจากวิเคราะห์ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะของ pMMP3-TA พบว่าเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมที่สุดคือ *Kpn*I และ *Bgl*II ที่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ออกจาก pMMP3-TA เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับ pSEAP2-control ดังนั้น pSEAP2-control และ pMMP3-TA จึงถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองซึ่งส่วนประกอบของสารเคมีดังตาราง 3.8 แล้วนำสารที่เตรียมเรียบร้อยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน (overnight)

และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ตาราง 3.8 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20	-	6
10x Tango buffer	2x	2
vector	-	1
10 unit/µl *Kpn*I	5 unit	0.5
10 unit/µl *Bgl*II	5 unit	0.5
total	-	10

2.7 การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 กับ pSEAP2-control

หลังจากตัดดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ออกจาก pMMP3-TA และเตรียม pSEAP2-control ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังข้อ 2.6 แล้วตัดเอาแถบดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการออกจากเจล ซึ่งขนาดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการสำหรับ MMP-3 และ pSEAP2-control ประมาณ 2,127 และ 5,100 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega, USA) โดยดำเนินการตามขั้นตอนที่อยู่ในคู่มือ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 เชื่อมต่อกับ pSEAP2-control ซึ่งประกอบด้วยสารดังตาราง 3.9 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และ 70°C 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ข้างต้นนำไปใช้สำหรับการส่งถ่ายเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรีย (transformation) เพื่อคัดเลือกเวคเตอร์ที่ต้องการ คือ เวคเตอร์ที่ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 เชื่อมต่อกับ pSEAP-control ด้วยวิธีตามขั้นตอน 2.2 แต่อาหารสำหรับการ spread แบคทีเรียนั้นเป็นอาหาร LB agar ที่มี 100 µg/ml ampicillin เท่านั้น

ตาราง 3.9 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการเชื่อมต่อดีเอ็นเอระหว่าง pSEAP-control และ MMP-3 promoter

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20	-	2
10x T_4 DNA ligase buffer	1x	1
PEG4000	-	1
MMP-3 promoter	-	3
pSEAP2-control	1 µg	2
5 unit/µl T_4 DNA ligase	5 unit	1
total		10

2.8 การตรวจสอบโคโลนีที่ต้องการด้วยวิธี colony PCR และการสกัดเวคเตอร์

หลังจาก transformation แล้วนำ colony ที่ได้มาตรวจหา colony ที่ได้รับเวคเตอร์ที่ต้องการ คือมีชิ้นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 แทรกอยู่ใน pSEAP-control ด้วยวิธี colony PCR ซึ่งหลักการของ colony PCR จะใช้ colony ที่ต้องการตรวจสอบนั้นละลายในส่วนผสมที่เตรียมไว้สำหรับการทำ PCR โดยตรง ซึ่งจะเมื่อเริ่มปฏิกิริยาของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้เตรียมสำหรับ PCR และอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพนั้นเพียงพอที่แตกเซลล์แบคทีเรียและดีเอ็นเอจะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ซึ่งดีเอ็นเอนี้จะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำ PCR และตรวจสอบจากขนาดของผลผลิต PCR โดยใช้ pSEAP primer (pSEAP-F: CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC และ pSEAP-R: CCT CGG CTG CCT CGC GGT TCC) ย้ายโคโลนีจากจานเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้รับการส่งถ่ายเวคเตอร์ละลายในสารละลายที่เตรียมไว้สำหรับการทำ PCR ดังตาราง 3.10 โดยใช้โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR ดังตาราง 3.11 โคโลนีแบคทีเรียบางส่วนจากจานเพาะเลี้ยงจะถูกย้ายมาเลี้ยงบน LB agar ที่มี 100 µg/ml ampicillin เพื่อใช้เป็น replica plate สำหรับโคโลนีที่ตรวจสอบ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ใช้เวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง นำผลผลิตที่ได้ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis เมื่อได้โคโลนีที่ต้องการแล้วทำตามขั้นตอน 2.4 เพื่อสกัดเวคเตอร์ที่ต้องการ และเรียกเวคเตอร์นี้ว่า **pMMP3-SEAP-control**

ตาราง 3.10 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการตรวจสอบโคโลนีแบคทีเรียเพื่อตรวจหาโคโลนีแบคทีเรียที่มีเวคเตอร์ที่ต้องการ ด้วย pSEAP primer

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20	-	19.3
10x Buffer+$MgCl_2$	1x	2.5
2.5mM dNTP	0.2mM	2
10 µM Fw	0.2 µM	0.5
10 µM Rv	0.2 µM	0.5
5 U/µl Taq DNA pol	1 U	0.2
total		25

ตาราง 3.11 โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิสำหรับการตรวจหาโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวคเตอร์ที่ต้องการด้วย pSEAP primer

ขั้นตอนของปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	นาที	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	5.00	1
denaturation	94	0.20	
annealing	60	0.30	
extension	72	1.30	38
final extension	72	7.00	1

2.9 การกำจัดดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออก SV40 ของเวคเตอร์ pMMP3-SEAP2-control

นำดีเอ็นเอเวคเตอร์ที่สกัดได้จากขั้นตอน 2.8 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Nru*I เพื่อกำจัดส่วนควบคุมการแสดงออก SV40 ซึ่งเป็น strong promoter ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน SEAP ใน pSEAP2-control เพื่อทำให้การควบคุมการแสดงออกของยีน SEAP อยู่ภายใต้การควบคุมของดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 โดยมีส่วนประกอบของสารดังตาราง 3.12 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที เนื่องจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I เป็นแบบ blunt end แต่ *Bgl*II เป็นแบบ 5'-

overhang ดังนั้นจึงต้องทำให้ปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *Bgl*II เป็น blunt end โดยเอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase เพื่อให้เวคเตอร์สามารถเกิดการเชื่อมต่อด้วยตัวเองได้ (self ligation) เตรียมส่วนประกอบสารเคมีดังตาราง 3.13 บ่มที่อุณหภูมิ 72°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำดีเอ็นมาเชื่อมต่อด้วยตัวเอง (self-ligation) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยมีส่วนประกอบของสารเคมีดังตาราง 3.14 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และ 70°C 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ข้างต้นไปส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย (transformation) เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับเวคเตอร์ที่ต้องการขั้นตอนเหมือน 2.8 และทำการเพิ่มปริมาณเวคเตอร์ที่ต้องการตามขั้นตอน 2.4 และนำเวคเตอร์ที่ได้ส่งหาลำดับเบส (1^{st} base, Malaysia) เพื่อยืนยันผลว่าเป็นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 พร้อมทั้งตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอว่าถูกต้องหรือไม่ และเรียกเวคเตอร์นี้ว่า **pMMP3-SEAP**

ตาราง 3.12 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Bgl*II และ *Nru*I

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20	-	6
10x Tango buffer	2x	2
pSEAP2-control vector	500 ng	1
10 unit/µl *Nru*I	5 unit	0.5
10 unit/µl *Bgl*II	5 unit	0.5
Total		10

ตาราง 3.13 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการสร้าง blunt end ด้วยเอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase

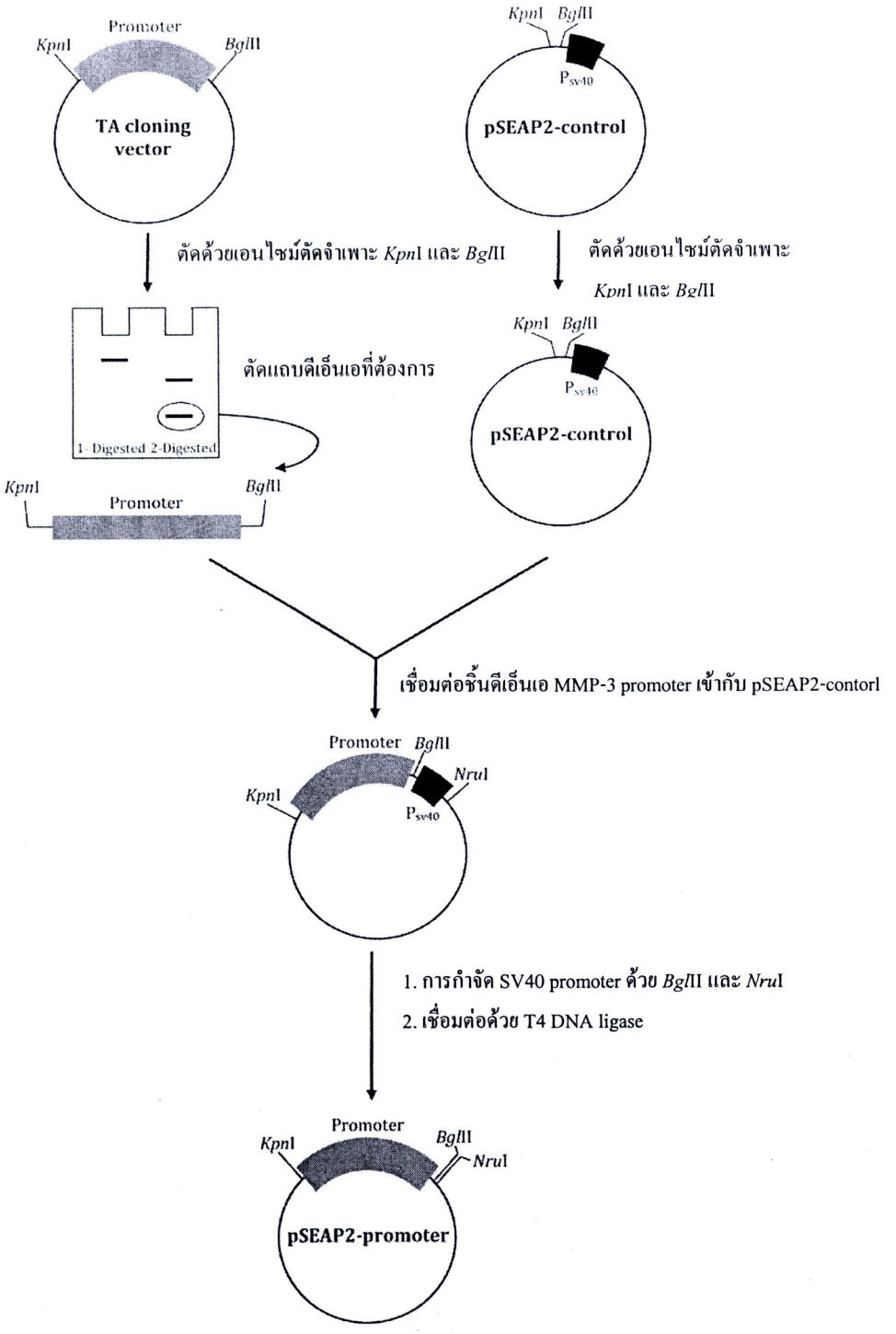
สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20		15.3
10x Buffer (KCl)	1x	2.5
25mM $MgCl_2$	2mM	2
2.5mM dNTP	0.2mM	2
5 U/µl *Pfu* DNA polymerase	1 U	0.2
DNA		2
total		25

ตาราง 3.14 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอแบบ self ligation

component	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
dH_20		2
10x T_4 DNA ligase buffer	1x	1
PEG4000	-	1
DNA	-	5
5 unit/µl T_4 DNA ligase	5 unit	1
total		10

2.10 การสกัดเวคเตอร์แบบ midi-prep

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีเวคเตอร์ของ pMMP3-SEAP มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่มี 100 µg/ml ampicillin ปริมาตร 150 ml นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อนำมาสกัดเวคเตอร์ที่ได้ปริมาณมากและปราศจาก endotoxin สำหรับการนำไปส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง SW1353 ด้วยชุดสกัดเวคเตอร์ขนาดกลาง NucleoBond®Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, Germany) ซึ่งขั้นตอนการสกัดจะดำเนินการตามวิธีในคู่มือ และเรียกเวคเตอร์นี้ว่า **pMMP3-SEAP**



รูป 3.1 แผนภาพแสดงการสร้างเวคเตอร์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3 โดยย่อ

การทดลองที่ 3 การทดสอบเวคเตอร์รายงานการแสดงออกของยีน MMP-3 ในเซลล์ SW1353

3.1 การหาอัตราส่วนของ X-treamHP (Roche,) กับ pMMP3-SEAP ที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง human chondrosarcoma (SW1353) แบบชั่วคราว (transient transfection)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ SW1353

เซลล์ human chondrosarcoma (SW1353) ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อ (Bone and Joint Research Laboratories) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เซลล์ SW1353 เลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มี 10% inactive fetal bovine serum 1% penicillin/streptomycin และ gentamycin บ่มในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C

2. การหาอัตราส่วนของ X-treamHP (Roche,) กับ pMMP3-SEAP ที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง human chondrosarcoma (SW1353) แบบชั่วคราว (transient transfection)

การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง SW1353 เตรียมเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม โดยให้แต่ละหลุมมีเซลล์อยู่ประมาณ 3.0-3.5 x 10^4 cell เลี้ยงเซลล์ไว้ในตู้ CO_2 incubator อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเตรียมสารสำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอ โดยใช้อัตราส่วนของ X-treamHP และ pMMP3-SEAP หลายอัตราส่วน ซึ่งวิธีการ คือ เจือจาง pMMP3-SEAP 2 µg ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี (fetal bovine serum) FBS ปริมาตร 100 µl ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเติม X-treamHP ตามอัตราส่วนดังตาราง 3.15 แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วหยดสารละลายนี้ปริมาตร 10 µl ในแต่ละหลุม โดยแต่ละอัตราส่วนจะทำซ้ำ 5 หลุม แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ SEAP ตามข้อ 3

ตาราง 3.15 อัตราส่วนระหว่าง X-treameHP และ pMMP3-SEAP สำหรับการเตรียมสารสำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ SW1353 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี FBS ปริมาตร 100 µl

อัตราส่วนของ X-treamHP : pMMP3-SEAP	X-treamHP (µl)	pMMP3-SEAP (µg)
3 : 2	3	2
4 : 2	4	2
6 : 2	6	2
8 : 2	8	2

3. การตรวจหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ SEAP ปริมาตร 80 µl ใส่จานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที เพื่อทำลาย endogenous alkaline phosphatase ของเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น แล้วเติมสารตั้งต้น 4 mg/ml pNPP ปริมาตร 100 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 4 ชั่วโมงหรือรอจนกว่าจะมีการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (ดัดแปลงจาก Berger *et al.*, 1988)

3.2 การทดสอบระบบเซลล์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3

1. การทดสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยสารอักเสบ interleukin-1β (IL-1β) หรือ lipopolysaccharide (LPS)

เตรียมเซลล์ SW1353 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 2-3x10^4 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสำหรับสำหรับการส่งถ่าย pMMP3-SEAP แบบชั่วคราว (transient transfection) โดยใช้อัตราส่วน 3:2 ตามขั้นตอนที่ 3.1 ข้อ 2 และเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียม IL-1β ความเข้มข้น 1, 10 และ 50 ng/ml และ LPS ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 5 และ 10 µg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี serum และทดสอบกับเซลล์ที่ถูกส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ ซึ่งใส่หลุมละ 100 µl กลุ่มควบคุมจะได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี serum โดยทำทดลองกลุ่มละ 2 ซ้ำ และนำ

เซลล์ไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ดังขั้นตอนที่ 3.1 ข้อ 3 และคำนวณหาค่า fold induction = $(OD405_{treatment}-OD405_{blank})/(OD405_{control}-OD405_{blank})$

2. การทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยง SW1353 ด้วยสาร interleukin-1β (IL-1β) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธี real-time PCR

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

เตรียมเซลล์ SW1353 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x15 mm ซึ่งมีเซลล์ประมาณ $1x10^6$ เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเตรียมสารอักเสบ IL-1β ความเข้มข้น 1, 10 และ 50 ng/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี serum และในแต่ละจานเพาะเลี้ยงจานละ 5 ml กลุ่มควบคุมจะได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี serum โดยทำทดลองกลุ่มละ 1 ซ้ำ และนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์ด้วยการ trypsinization เติม 500 µl TE buffer 1% SDS และ 5 µl 5 mg/ml proteinase K บ่มทิ้งไว้ที่ 45°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยสลายเซลล์ให้ปลดปล่อยสารพันธุกรรม แล้วเติม 500 µl Trizol® reagent และ 500 µl chloroform นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000xg นาน 15 นาที อุณหภูมิ 4°C ดูดสารละลายใสด้านบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 ml เติม isopropanol 2 เท่าของสารละลายที่ดูดมา แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000xg นาน 15 นาที อุณหภูมิ 4°C จะเห็นตะกอนของอาร์เอ็นเอสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้ง หลังจากนั้นนำตะกอนนี้ไปกำจัดดีเอ็นเอส่วนเกินที่อาจจะติดมาด้วย DNase I แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2-3 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วทำการกำจัด DNase I ออกจากสารละลายด้วยสาร phenol:chloroform (1:1) แล้วตกตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วย absolute ethanol เหมือนขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (การทดลองที่ 1 ขั้นตอนที่ 1.2)

2.2 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (complementary DNA; cDNA)

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ SW1353 ข้อ 2.1 จะทำให้กลายเป็นซีดีเอ็นเอสายคู่โดยใช้เอนไซม์ M-MuLV® Revertid reverse transcriptase มีขั้นตอนดังนี้

เตรียม PCR tube ใหม่ 2 หลอด โดยในหลอดแรกเติมสารดังนี้ oligo dT_{12} (500 µg/µl) ปริมาตร 1 µl DEPC water ปริมาตร µl (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของอาร์เอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา) และอาร์เอ็นเอต้นแบบปริมาตร 7 µl ผสมสารทั้งหมดในหลอดใหม่เข้ากันจากนั้นจึงบ่มไว้

ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาทีแล้วจึงนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 1-2 นาทีหลังจากนั้นเตรียม PCR tube ใหม่หลอดที่สอง โดยเติมสาร 5X reaction buffer ปริมาตร 4 µl, RiboLock™ RNase Inhibitor 20 U, 1 mM dNTP และ M-MuLV® Revertid reverse transcriptase 40 U แล้วนำสารจาก PCR หลอดแรกเติมในหลอดที่สอง ผสมให้เข้าแล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 90 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที เมื่อเสร็จสมบูรณ์แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20°C

2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR

นำซีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 2.2 ผสมสารเคมีดังตาราง 3.16 เพื่อดูปริมาณการแสดงออกของยีน MMP-3 เทียบกับ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) โดยใช้ไพร์เมอร์ดังตาราง 3.17 และโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ดังตาราง 3.18 โดยใช้เครื่อง real-time PCR รุ่น MyiQ5 (BioRAD, USA)

ตาราง 3.16 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการทำ real-time PCR

สารที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
RNase free water		20
2X Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix	1x	2.5
10mM dNTP	0.2 mM	0.5
10 µM Fw	0.2 µM	0.5
10 µM Rv	0.2 µM	0.5
cDNA		1
total		25

ตาราง 3.17 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ real-time PCR

ยีน (accession number)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-->3')	Ta(°C)	size (bp)
MMP3	Forward: 5'-CTTTTGGCGAAAATCTCTCAG-3'		
(NM_002422)	Reverse: 5'-AAAGAAACCCAAATGCTTCAA-3'	57	404
GAPDH	Forward: 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCAT-3		
(NM_002046)	Reverse: 5'-GTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3'	57	370

Ta = annealing temperature

ตาราง 3.18 โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิที่ใช้สำหรับ real-time PCR

ขั้นตอนปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	นาที	จำนวนรอบ
Pre-denaturing	95	5.00	1
denaturing	94	0.20	
annealing	ตาราง 3.16	0.30	
extension	72	1.30	38
final extension	72	7.00	1

2.4 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนจากการศึกษาด้วยวิธีการ real-time PCR

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีน MMP-3 อาศัยการคำนวณจากข้อมูลดิบที่ได้จากกราฟของปฏิกิริยา real-time PCR และนำมาคำนวณตามวิธีการ $2^{-\Delta\Delta_{CT}}$ ของ Livak และ Schmittgen (2001) โดยใช้ยีนGAPDH เป็นยีนฐานในการเปรียบเทียบระดับการแสดงออก

3. การทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมเซลล์ SW1353 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยมีเซลล์ประมาณ 3-3.5 x 10^4 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสำหรับสำหรับการส่งถ่าย pMMP3-SEAP แบบชั่วคราว (transient transfection) โดยใช้อัตราส่วน 3:2 ตามขั้นตอนที่ 3.1 ข้อ 2 และเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม IL-1β ความเข้มข้น 20 ng/ml

50 µl และเติม 50 µl doxycycline ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50 หรือ 2 µg/ml เติมสารทั้งสองชนิดพร้อมกัน โดยทำการทดลองกลุ่มละ 2 ซ้ำ เลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของ SEAP และคำนวณหา % expression = $[(OD405_{treatment}-OD405_{blank})/ (OD405_{control}-OD405_{blank})]x100$ โดยใช้กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IL-1β เป็นกลุ่มควบคุม

$OD405_{treatment}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบกิจกรรมของ SEAP จากอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสมุนไพรหรือdoxycycline ร่วมกับการกระตุ้นด้วยสาร 10 ng/ml IL-1β

$OD405_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบกิจกรรมของ SEAP จากอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารกระตุ้น 10 ng/ml IL-1β และ 0.4% DMSO

$OD405_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบกิจกรรมของ SEAP จากอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มเซลล์ที่มีเฉพาะ 0.4% DMSO อย่างเดียว

การทดลองที่ 4 การทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ด้วยสมุนไพรไทยบางชนิด

1. การทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ด้วยสมุนไพรไทยบางชนิด

ขั้นตอนเหมือน 3.2 ข้อ 3 ซึ่งเปลี่ยนจากสารทดสอบ doxycyclin เป็นสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ตัว คือ น้ำ และเอทานอล (ethanol) ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ยิ่งมณี ตระกูลพัว ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สารสกัดสมุนไพรทั้งหมดจะถูกละลายใน dimethysulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นที่ใช้ คือ 1, 10, 50 หรือ 100 μg/ml ในแต่ละสมุนไพร และสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 6 ชนิด แสดงดังตาราง 3.19 โดยทำการทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำ และนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP เพื่อคำนวณหาค่าสูตรดังนี้

$$\% \text{ expression} = [(OD405_{treatment} - OD405_{blank}) / (OD405_{control} - OD405_{blank})] \times 100$$

โดยใช้กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IL-1 β เป็นกลุ่มควบคุม

ตาราง 3.19 ชื่อสมุนไพรที่ใช้สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ สำหรับการทดสอบการแสดงออกยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1β ด้วยระบบเซลล์รายงานผล

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้สกัด
ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus niruri L* (PN)	ทั้งต้น
หญ้าดอกขาว	*Vernonia cinerea* Less. (VC)	ทั้งต้น
ขลู่	*Pluchea indica* Less. (PI)	ใบ
ทองพันชั่ง	*Rhinocanthus nasutus* Karz. (RN)	ใบ
ไพล	*Zingiber cassumunar* Roxb. (ZC)	เหง้า
เพชรสังฆาต	*Cissus quadrangularis* Linn. (CQ)	ลำต้น

2. การทดสอบการความเป็นพิษของเซลล์ SW1353 (cytotoxicity) ด้วยสมุนไพรไทยบางชนิด

เซลล์ SW1353 จะถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษของสมุนไพร (cytotoxicity) ด้วยวิธี MTT (3-9,4,5 dimethylthiazol-2yl-2,5 diphenyltertrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, MO, USA) assay

วิธีการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

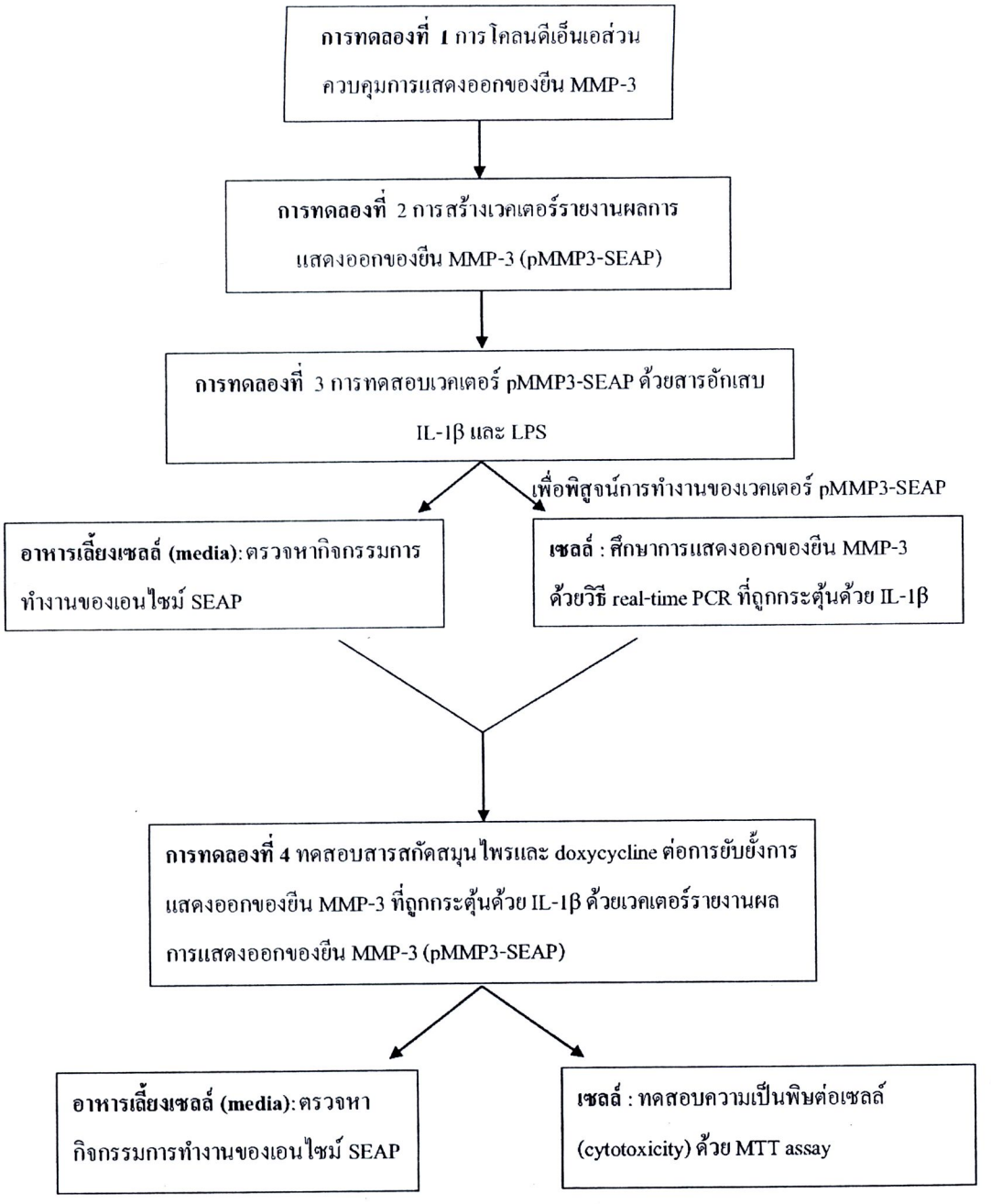
หลังจากที่นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากข้อ 1 ไปตรวจหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP แล้ว นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์เติมสาร 2.5 mg/ml MTT หลุมละ 20 µl และนำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด MTT ทิ้งแล้วเติม DMSO 50 µl ในแต่ละหลุม แล้วทิ้งไว้ 10 นาทีจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และนำไปหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต โดยใช้กลุ่มที่ทดสอบด้วย 10 ng/ml IL-1β เป็นกลุ่มควบคุมดังสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ cell viability} = (OD540_{sample} - OD540_{blank}) / (OD540_{control} - OD540_{blank}) \times 100$$

OD540 sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงเพื่อตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ในกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยสมุนไพรแต่ละความเข้มข้นร่วมกับสารกระตุ้น 10 ng/ml IL-1β

OD540 control คือ ค่าการดูดกลืนแสงเพื่อตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ในกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยสาร 10 ng/ml IL-1β ที่มี 0.4% DMSO ผสมด้วย

OD540 blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงเพื่อตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ในหลุมที่ไม่มีเซลล์แต่มีการเติมสาร MTT



แผนภาพสรุปการทดลองการสร้างเวคเตอร์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธีการ reporter gene assay