ระเบียบวิธีการวิจัย/การทดลอง

สารเคมีที่ใช้

1. 7-Aminonaphthalene -1,3,5- trisulfonic (Wako)
2. 25% Ammonia solution (Riedel-de Haën)
3. Ethyl-3-aminobenzoate (Merck)
4. N,N-Dimethylformamide (Fischer Scientific)
5. 1- Phenyl isocyanate (Acros)Sodium dihydrogen phosphate water-free puriss (Fluka)
6. di-Sodium hydrogen phosphate water-free puriss (Fluka)
7. Sodium hydroxide (KMF lab)
8. Triethylamine (Fluka)
9. Triphosgene (Acros)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Novostar® Microplate-Reader
2. ขวดเลี้ยงเชื้อ (Cellstar® T175 and T75)
3. ตู้เลี้ยงเชื้อ
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง
5. เครื่องเขย่า
6. เครื่องวัด pH
7. เครื่อง hydrogenator

น้ำยาเลี้ยงเชื้อ และสารละลายที่ใช้

น้ำยาเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) 500 ml fetales FBS 10% L-glutamine5 mM Pennicillin G100 U/ml Streptomycin100 µg/ml G418 (Geneticinsulfate) 200 µg/ml

Krebs-HEPES-Buffer stock solution (ความเข้มข้น 5 เท่า, 5x) ประกอบด้วย Sodium chloride 17.33 g, D-Glucose monohydrate 5.796 g HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid 5.958 g Potassium chloride 0.876 g, Sodium hydrogen carbonate 0.882 g Potassium dihydrogenphosphate 0.408 g ละลายในน้ำกลั่น 450 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1N NaOH.และจึงปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml.ด้วยน้ำกลั่น

Calcium chloride (1 M) เตรียมโดยการใช้ Calcium chloride dehydrated 1.470 gละลายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 ml

Magnesium sulphate (1 M) โดยการใช้ Magnesium sulphate heptahydrate 2.465 gละลายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 ml

การเตรียม Krebs-HEPES-Buffer (KHB) solution (1x) ทำโดยการใช้ 100 ml KHB stock solution (5x) นำมาเติม 1 M $CaCl_2$ 650 µl และน้ำให้ได้ประมาณ 400 ml เติม 1 M $MgSO_4$ 600 µl และปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml.

1321N1 เซลล์

1321N1 astrocytoma cells recombinantly expression of $P2Y_1$, $P2Y_2$, และ $P2Y_{11}$ receptors ที่ใช้ได้จากห้องปฏิบัติการของ Prof.Dr. Matthias U Kassack, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf, Germany และเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's modified Eagle Medium ที่มี sodium pyruvate, glucose(4500mg/L) penicillin G100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml, 10% fetal bovine serum, L-Glutamine 5 mM และ G418200 µg/ml. ในตู้เลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 35 °C

วิธีทดลอง

1. การสังเคราะห์สาร

เติมสาร isocyanante ลงในสารประกอบเอมีนและ triethylamine ที่ละลายในน้ำ stir และตรวจสอบโดยการใช้ TLC จนเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จากนั้นกรองและสกัดด้วย diethyl ether 2-3 ครั้ง ชั้นน้ำนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotator evaporator

2. การวิเคราะห์โครงสร้างสารที่ได้

สารที่สังเคราะห์ได้ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ NaCl หาความบริสุทธิ์โดยใช้ HLC และ HPLC การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทำโดย ^1H และ ^{13}C NMR, Mass spectrometry และ elemental analysis

การหาปริมาณเกลือ NaCl ทำได้โดย ชั่งสาร 20 มิลลิกรัมละลายด้วยน้ำ 8 ml.และ glacial acetic acid 2 ml แล้วไทเทรตด้วยสารละลาย 0.1 N $AgCl_2$ โดยใช้ potentiometer เป็นตัววัดจุดยุติ

การวิเคราะห์ด้วย ^1H และ ^{13}C NMR - ละลายสารด้วย d_6-DMSO และส่งวิเคราะห์ด้วย Brucker DRX 500 MHz Spectrometer

Mass spectrometry - ส่งวัดที่ chemistry department, University of Duesseldorf โดยใช้เครื่อง Brucker Deltinics flexAnalysis และใช้ dihydroxy benzoic acid (DHB) เป็น matrix

3. การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต่อ $P2Y_1$, $P2Y_2$, และ $P2Y_{11}$ receptors ทำโดยการใช้การวัดการเรืองแสงของ intracellular calcium

3.1. การเตรียมสารตัวอย่างทดสอบ

ละลายสารในน้ำหรือ DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 10 mM หลังจากนั้นทำให้เจือจางด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 10^{-9} – 10^{-4} โมลาร์

3.2 การเตรียมเซลล์

เซลล์ที่มีการเจริญเติบโตประมาณ 90% ของขวดเลี้ยงเชื้อให้เกี่ยวเชื้อโดยการใช้.05 % trypsin/0.02 % EDTA จำนวน 3 มล. และ ล้างซ้ำด้วยน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 10 มล. หลังจากนั้นนำไปปั่น ตะกอนที่ได้นำมาละลายกลับด้วยน้ำยาเลี้ยงเชื้อ และ incubated ในตู้เลี้ยงเชื้อที่ 37°C ใน 5 % CO_2 เป็นเวลา 30 นาที ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ และกระจายตัวกลับด้วยบัฟเฟอร์ให้ได้ปริมาตร 500 µl ถ่ายเซลล์ลงใน vial ที่บรรจุ Oregon Green G488® BAPTA-1AM 3 µl และ pluronic F-

1273 µl และเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที ปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง หลังจากนั้นให้กระจายกลับด้วยบัฟเฟอร์และใส่ลงใน 96 well plates ให้มีความเข้มข้นของเซลล์อยู่ในช่วง 50 -100,000 cells/well.

3.3 การวัดความเข้มในการเรืองแสง

ในการทดสอบฤทธิ์ agonist ให้เติมสารทดสอบ 20 µl และวัดค่าความเข้มของการเรืองแสง ส่วนการทดสอบ antagonist จะดูการเรืองแสงภายหลังการเติมสารทดสอบ 30 นาที แล้วจึงเติมสาร agonist มาตรฐาน

การวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซสซ์จะใช้วัดโดยมีค่า excitation ที่ 485 nm และ emission ที่ 520 nm ทุก 0.4 วินาทีนาน 30 วินาที

3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

การตอบสนองต่อการกระตุ้นรีเซบเตอร์วัดได้จากการวัดความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ภายหลังจากการฉีดสาร และคำนวณโดยใช้โปรแกรม excel เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายบัฟเฟอร์และสารมาตรฐาน วัดโดยการเปรียบเทียบการกระตุ้นที่ 50% (EC_{50}) ในส่วนของฤทธิ์ antagonist จะวัดโดยดูการยับยั้งการตอบสองโดยใช้สารในความเข้มข้น 100 µM ทำการ pre-incubated ที่อุณหภมิ 37°C นาน 30 นาที หลังจากนั้นจึงใส่ สารมาตรฐาน agonist และดูผลการยับยั้ง คิดเป็น % inhibition และแสดงออกมาเป็น % และนำมาคำนวณหาค่า pKi