บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเตรียมน้ำคั้นมะขามป้อมสดในรูป freeze-dried

นำผลมะขามป้อมสดจำนวน 57 ลูก นำมาแยกเมล็ดออก จะได้เนื้อผลมะขามป้อมสด 302.95 กรัม จากนั้นนำไปคั้นน้ำแยกกาก ได้น้ำคั้น 167 มิลลิลิตร และนำไปปั่นตกตะกอนที่ 3000x*g* นาน 10 นาที จะได้น้ำค้นมะขามป้อมใสปริมาณ 157 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปกรอง 0.2 µm อีกครั้ง นำน้ำที่กรองแล้วจำนวน 50 มิลลิลิตร ไปทำให้แห้งแบบเย็น จะได้สารในรูปของผงแห้งจำนวน 8.05 กรัม (16.1% w/v)

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในมะขามป้อมด้วย HPLC

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในน้ำคั้นมะขามป้อมด้วย HPLC (Thermo Scientific) ใช้สภาวะดังนี้ คือ Column Luna C18 (100A, 5µm, 150×4.60 mm., Fortune Scientific CO.,LTD, Bangkok, Thailand), mobile phase เป็น 100 mM phosphate buffer 95% : Methanol 5%, UV-detector แบบ isocratic elution วัดที่แสงความยาวคลื่น = 243 nm, injection volume 20 µL, flow rate 0.4 mL/min (1)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid (Vitamin C) โดยเตรียม stock solution ความเข้มข้น 10 mg/mL โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย และเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/mL และเจือจางต่อจนได้ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8, 10 µg/mL แล้วกรองด้วย cellulose acetate filter (0.22 µm) และนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปทำ calibration curve การทดสอบน้ำคั้นมะขามป้อมจะเตรียมสารที่ความเข้มข้น 1 mg/mL และทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate) และนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปคำนวณแปลผลปริมาณวิตามินซีในน้ำคั้นมะขามป้อม ในรูป % w/w

2.3 *การหาปริมาณ Total phenolic compound ในน้ำคั้นมะขามป้อม*

การหาปริมาณ Total phenolic compound ในน้ำคั้นมะขามป้อม จะวัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay โดยใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากนำ Standard มา dilute ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 µM, 31.25µM, 62.5 µM, 125µM, 250 µM, 500 µM, 1,000 µM) เพื่อใช้สร้าง calibration curve จากนั้นเตรียมหลอดทดลองให้พอ และเติมน้ำกลั่น 1.58 mL ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด จากนั้น เติม Folin-Ciocalteu reagent 100 µL ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด และเติม Sample หรือ Standard เติมลงไป 20 µL เขย่าให้เข้ากัน และเติม sodium carbonate solution 300 µL ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด และเขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองและนำไป incubate ที่ 40°C เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาตั้งที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 756 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer (Shimadsu UV-1601, Japan) การทดสอบน้ำคั้นมะขามป้อมจะเตรียมสารที่ความเข้มข้น 10 mg/mL และทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate) และคำนวณแปลผลปริมาณสารฟีนอลรวมเฉลี่ยในรูปไมโครกรัม ของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อน้ำคั้นมะขามป้อมในรูปผงแห้ง 1 ไมโครกรัม (23) นำเปรียบเทียบกับครั้งก่อน (ผลเมื่อ 6 เดือนก่อน)

2.4 *การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นมะขามป้อม*

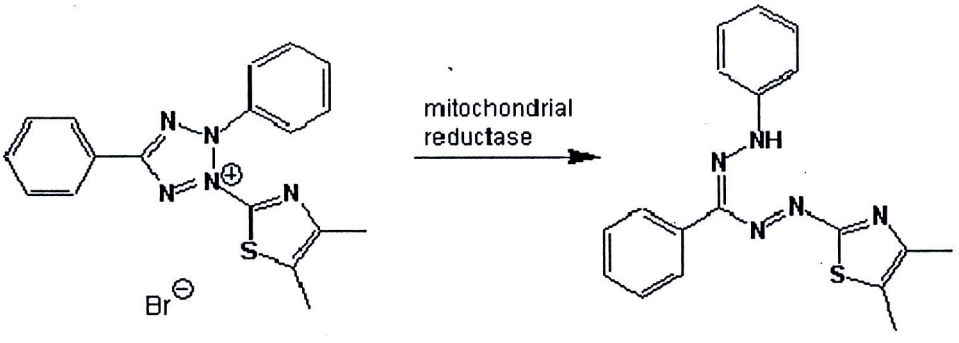
การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นมะขามป้อม จะวัดด้วยวิธี FRAP [Ferric Reducing/Antioxidant Power] assay โดยใช้ $Fe(II)SO_4.7H_2O$ เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากนำ Standard มา dilute ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM) จากนั้น นำ Sampleและ Standard เติมลงในหลุมๆละ 10 µL และเติม FRAP Reagent [ประกอบด้วย Acetate Buffer 300 mM (pH 3.6), TPTZ 10 mM in HCl 40 mM and $FeCl_3.6H_2O$ 20 mM] ลงไปหลุมละ 200 µL และนำไปอ่านด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 595 nm นำค่าที่ได้ไปเทียบกับสารมาตราฐานเพื่อหาค่า FRAP value (24) นำเปรียบเทียบกับครั้งก่อน

2.5 การสกัดและเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

สายสะดือที่ได้มาจากโรงพยาบาลนั้นจะแช่อยู่ในถุงที่มีน้ำเกลือ ล้างสายสะดือด้วย 70% EtOH ใช้กรรไกรตัดปลายทั้งสองข้างของสายสะดือทิ้งไป จากนั้นล้างหลอดเลือดในสายสะดือจนใสสะอาด และเติม Collagenase ลงไปแล้วจึงผูกปลายทั้งสองข้าง นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 25 นาที และใช้กรรไกรตัดด้ายที่ผูกไว้ออก ใส่ Media ที่มี FBS ลงไป นำน้ำที่ได้ไปปั่นตกตะกอนเซลล์ เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงใน Flask ขนาด T25 และเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน (25)

2.6 การทดสอบผลของน้ำคั้นมะขามป้อมต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) จะวัดได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด ทั้งนี้ MTT assay เป็นวิธีการวัดเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม และกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดลองต่างๆ โดยมีหลักการ คือ วัดความสามารถของเอนไซม์ dehydrogenase ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตในการทำปฏิกิริยาตัดส่วน tetrazolium rings ในโมเลกุลของ MTT ซึ่งมีสีเหลือง ให้กลายเป็นสารในรูปของ formazan ซึ่งมีสีน้ำเงิน-ม่วงและไม่ผ่านออกจากเซลล์เมมเบรน แต่จะตกผลึกอยู่ภายในเซลล์ที่มีชีวิต หลังจากนั้นก็ละลายสารที่ตกผลึกด้วย detergent ปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ วัดสีของ formazan โดยใช้ ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 550-600 นาโนเมตร (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน MTT เป็น formazan โดย mitochondrial reductase

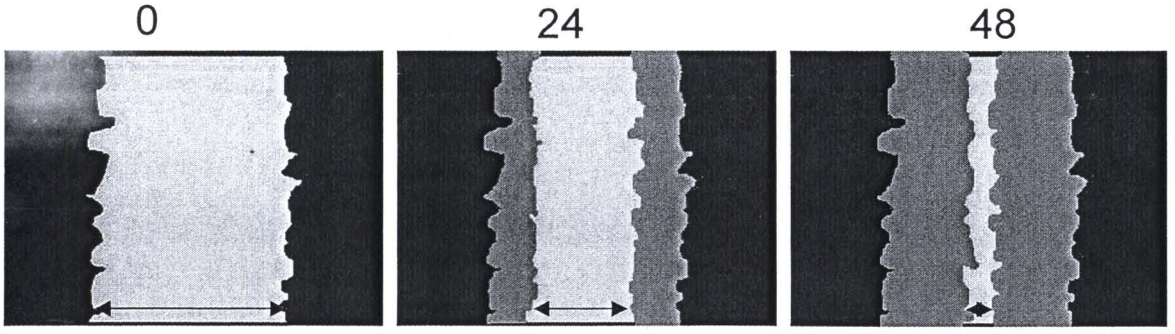
วิธีทดลอง

เลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณ serum ต่ำ (1%) เพื่อลดผลของ growth factors อื่นๆลง โดยจะเลี้ยงเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 4 x 10^4 เซลล์ต่อหลุม และเลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสมุนไพรหรือสารเคมีที่ความเข้มข้นต่างๆลงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมที่มีเซลล์อยู่ และนำไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มเซลล์ที่มีสภาวะข้างต้นนาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น เติมสารละลาย MTT (3 – (4,5 – dimethylthiazol – 2 - yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide) ลงไปหลุมละ 10 µL และนำเข้าไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มเซลล์ที่มีสภาวะข้างต้นนาน 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงิน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และเติม DMSO (Dimethyl sulfoxide) ลงไปหลุมละ 100 µL นำไปเขย่าก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (Thermo Multiskan EX, Finland) ซึ่งความเข้มของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

2.7 *การทดสอบของน้ำคั้นมะขามป้อมต่อการสมานแผลแบบ in vitro (Scratch wound closure assay)*

การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นสมานแผลนั้น จะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุมให้มีเซลล์ประมาณ 100% confluency ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 20% serum หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ไปเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ 1% serum เพื่อลดผลของ growth factors อื่นๆลง แล้วทำให้เกิดแผลโดยการใช้ปลาย pipette tip ขูดลงไปบนเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่เลี้ยงไว้ จากนั้นเติมสารสมุนไพรหรือสารเคมีลงไป และศึกษาผลการสมานแผลของน้ำคั้นมะขามป้อมโดยจะติดตามการสมานแผลหรือการปิดของแผลที่ช่วงเวลาต่างกันคือ 24 และ 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ จะถ่ายภาพเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดไว้แล้วจึงนำไปวัดระยะห่างของแผลที่เกิดขึ้น (26)

การวัดระยะห่างที่เกิดขึ้นหรือการวัดระยะห่างของบาดแผล จะนำภาพถ่ายของเซลล์ในช่วงเวลาต่างกันที่กำลังขยายเท่าๆกันไว้มาวัดระยะห่างด้วยโปรแกรม Cell^B (Olympus, http://www.microscopy.olympus.eu/microscopes/Software_cell_B.htm) ซึ่งจะได้ค่าระยะห่างของแผลในแต่ละช่วงเวลา และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า %Wound confluence ของแต่ละช่วงเวลาที่ทำการวัด



$$\%\text{Wound confluence at a specific time point} = \frac{(\text{Baseline width} - \text{Time width})}{\text{Baseline width}} \times 100$$

นำค่าที่ได้จากการคำนวณด้วยสูตรข้างต้นไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Wound confluence กับ Time (Hour) ซึ่งถ้าค่า %Wound confluence ยิ่งมากจะหมายถึงการปิดของแผลมาก หรือรอยแผลมีขนาดเล็กลงนั่นเอง

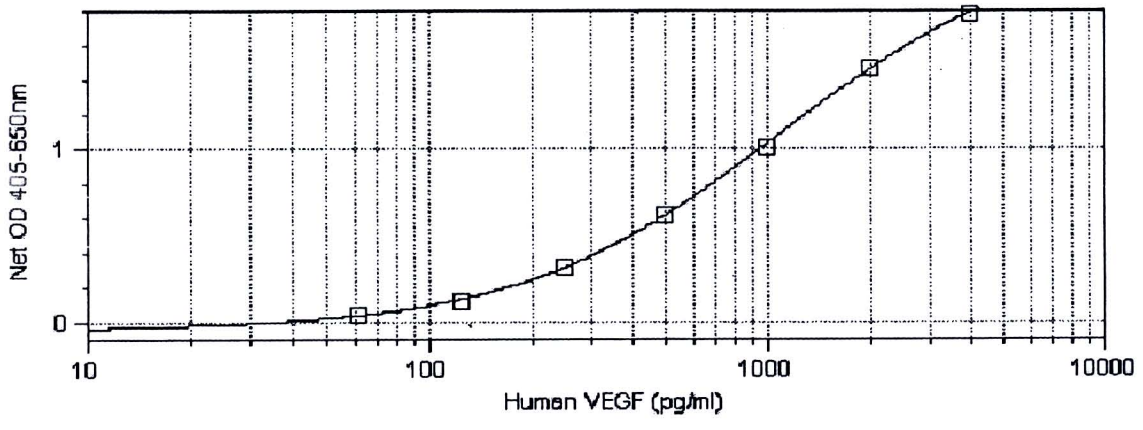
2.8 การวัดปริมาณ VEGF ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี competitive ELISA

ในการวัดปริมาณ VEGF ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี competitive ELISA นั้นใช้ชุดการศึกษาสำเร็จรูป (Human VEGF ELISA Development Kit, Cat#900-K10 Lot#1006010, Peprotech, USA) ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาดังต่อไปนี้

- ขั้นตอนแรกเป็นการเตรียม plate โดยการเตรียม Capture antibody ใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 µg/mL และเติมลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 µL ปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน
- ดูดส่วนใสใน plate ออกและล้างด้วย Wash buffer 300 µL จำนวน 4 ครั้ง
- เติม Blocking buffer 300 µL ต่อหลุม และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนใสใน plate ออกและล้างด้วย Wash buffer 300 µL จำนวน 4
- เตรียม Human VEGF standard ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 0-2 ng/mL ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (1% FBS M199) และเติมลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 µL จากนั้นปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง
- ดูดส่วนใสใน plate ออกและล้างด้วย Wash buffer 300 µL จำนวน 4 ครั้ง ในครั้ง

- เตรียม Detection antibody ด้วย diluent ให้ได้ความเข้มข้น 0.25 µg/mL และเติมลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 µL ปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง
- ดูดส่วนใสใน plate ออกและล้างด้วย Wash buffer 300 µL จำนวน 4 ครั้ง ในครั้งสุดท้าย
- เตรียม avidin-HRP conjugate ด้วย diluent ในอัตราส่วน 1:2000 และเติมลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 µL ปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
- ดูดส่วนใสใน plate ออกและล้างด้วย Wash buffer 300 µL จำนวน 4 ครั้ง
- เติม ABTS Liquid Substrate ลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 µL และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง 405 nm (Kinetic mode, 3 min/interval, 30 min)

นำอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm มาเขียน Standard curve ระหว่าง Human VEGF (pg/mL) กับ OD 405 nm และนำค่า sample มาหาปริมาณ Human VEGF (pg/mL) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการวัดปริมาณ VEGF จาก standard ใน ELISA kit (Human VEGF ELISA Development Kit, Peprotech, USA)

2.9 การศึกษาฤทธิ์ต่อการเพิ่มระดับ mRNA ของ VEGF ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดภายหลังได้รับน้ำคั้นมะขามป้อม

ทำการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดใน 24 wells microplate และบ่มรวมกับสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัด total RNA โดยใช้วิธีของ Trizol reagent โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ล้างเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่อยู่ใน 24 wells microplate ด้วย PBS จำนวน 1 รอบ และเติม 250 µL Trizol และนำมาวางที่อุณหภูมิห้องนานเป็นเวลา 15 นาที
- ดูดส่วนใสสีแดงใส่ eppendrof tube (RNase-free tube)
- เติม chloroform 50 µL และนำไป vortex แรงๆนาน 15 วินาที จากนั้นนำมาวางที่อุณหภูมิห้องนานเป็นเวลา 5 นาที
- นำไปปั่นที่ 12,000 xg 4°C เป็นเวลานาน 15 นาที
- ดูดส่วนใสชั้นบนประมาณ 60 µLไปใส่ eppendrof tube(Rnase-free tube) อันใหม่
- เติม isopropyl alcohol 125 µL ลงใน eppendrof tube และเขย่าหลอดเบาๆ(เคาะข้างหลอดเบาๆ จากนั้นนำมาวางที่อุณหภูมิห้องนานเป็นเวลา 10 นาที
- นำไปปั่นที่ 12,000 xg 4°C เป็นเวลานาน 10 นาที
- เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และซับด้วยกระดาษให้แห้งพอหมาด
- เติม 1 ml 75% EtOH และ vortex เบาๆ จากนั้นนำไปปั่นที่ 7,000 xg 4°C เป็นเวลานาน 5 นาที
- เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และซับด้วยกระดาษให้แห้งพอหมาด
- ตั้งให้ RNA pellet แห้ง (ตั้งเทเอียงไว้) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 15 min (เคาะหยดน้ำออกให้หมด)
- ละลาย RNA ด้วย 20 µL DEPC-treated water และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นเก็บ RNA ที่ได้ในตู้เย็น -70°C

เมื่อได้ RNA เป็นที่ต้องการแล้ว หลังจากนั้นจะนำ RNA ที่ได้มานั้นไปเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วย DyNamo™ cDNA Synthesis kit (F-4705) (Finnzymes, Finland) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- เตรียม Master mix จาก kits

Preparation Master Mix: 15 µL/ tube = 1 Reaction

Oligo dT primer	1
2X RT Buffer	10
RT enzyme mix	2
Rnase-Free water	2
Template : RNA Sample	5
Total	20

- เขียนหมายเลขบน tube PCR ตามจำนวนหลอดที่ต้องการ
- เติม Template: RNA Sample 5 µL ลงใน PCR tubes
- นำไป incubate 65 °C นาน 5 นาที ด้วยเครื่อง Thermocycle (Mastercycler® personal, Eppendorf, Deutschland)
- เติม Master Mix 15 µL ลงใน tube ข้างต้น แล้วนำไป vortex เบาๆ
- ใส่เครื่อง Thermocycle

25 °C	10 min
40 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	Hold

- เก็บ cDNA ได้ที่ตู้เย็น -30 °C

เมื่อได้ cDNA แล้ว หลังจากนั้นจะนำไปตรวจวัดการแสดงออกของ VEGF mRNA แบบ semi-quantitative โดยวิธี Real Time-PCR โดยใช้ Dynamo™ Flash SYBR®Green qPCR kit (F-415) (Finnzymes, Finland) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ละลาย cDNA, Primer และ Master Mix 2X ในน้ำแข็ง
- เขียนหมายเลขบน tube PCR ตามจำนวนหลอดที่ต้องการ
- เติม DEPC-treated water ใน PCR tube ละ 7 µL
- เติม Master mix 2X ใน PCR tube ละ 10 µL
- เติม primer mix [eNOS, ß-actin] ใน PCR tube ละ 2 µL

Primer sequences:

VEGF primer

Forward: 5'- TATTTTTCTTGCTGCTAAAT -3'

Reverse: 5'- GTGAAGACACCAATAACATT -3'

β-actin primer

Forward: 5'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'

Reverse: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

- เติม cDNA Sample ใน PCR tube ละ 1 µL แล้วผสมให้เข้ากัน
- นำไปใส่ในเครื่อง Real time PCR (Rotor Gene 6000, Corbett Life Science, Australia)

Hold	95 °C	7	นาที
Cycle: 60	95 °C	10	วินาที
	45 °C	15	วินาที
	72 °C	20	วินาที
Melt	72 – 95°C		

2.10 การศึกษาฤทธิ์ต่อการงอกของหลอดเลือดใหม่ด้วยวิธี sprouting assay

การศึกษาการงอกของหลอดเลือดใหม่สามารถทำได้โดยการวัดการงอก (sprout) ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดเมื่อเรียงตัวอยู่ในเมทริกซ์ที่เป็นสามมิติ ซึ่งเป็น quantitative model สำหรับการทดสอบแบบ in vitro โดยทำการวัดความยาวของรยางค์ที่งอกออกมาจากเมทริกซ์ที่อยู่ในรูปทรง spheroid ซึ่งมีส่วนผสมที่เลียนแบบโครงสร้างเมทริกซ์ตามธรรมชาติ ผสมกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด มีวิธีเตรียมดังนี้

1. เตรียม spheroid ของ HUVEC โดยใช้ methocel (Fluka) 200 µL (20%), 20%FBS M199 700 µL และ cell stock 10^6 cell/mL 100 µL จากนั้นใช้ tip เหลืองตัดปลายผสมให้เข้ากัน และ seed spheroid 20 µL/sprout บนจานเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm จำนวน 5 จาน หลังจากนั้นกลับจานเลี้ยงขึ้นเพื่อให้เซลล์จัดเรียงตัวเป็นก้อน spheroid นานข้ามคืน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 01 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247381
เลขเรียกหนังสือ

2. วันต่อมา จะเก็บ spheroid โดยใช้ tip เหลืองตัดปลาย และนำใส่ใน eppendorf ที่มี PBS [+2%FBS] 300 µL (ประมาณ 50 spheroids/eppendorf) จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 4 °C ความเร็ว 5,800 rpm นาน 3 นาที
3. เตรียม M199-collagen โดยผสมอย่างนุ่มนวลระหว่าง 0.5 mL M199 10X และ 4 mL collagen จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง
4. เตรียม methocel-FBS โดยผสมอย่างนุ่มนวล ระหว่าง 4 mL methocel + 1 mL FBS จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง
5. นำ eppendorf ที่ centrifuged แล้วมาเทส่วนใสทิ้ง และใช้ tip เหลืองตัดปลายดูดผสมกัน จากนั้นดูดมาใส่ใน 5 mL methocel-FBS
6. นำ M199-collagen มา neutralized ด้วย 0.2N NaOH ประมาณ 1.5 mL (จะเปลี่ยนสีเหลืองเป็นสีแดง) จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง
7. นำ 6 mL methocel-FBS-cell มาผสมรวมกับ 6 mL Neutralized collagen อย่างนุ่มนวล (ระวังฟอง)
8. จากนั้น ดูดสารที่ผสมแล้วประมาณ 800 µl/well ใส่ใน 24-wells plate และเลี้ยงใน 37 °C นาน 1 ชั่วโมง
9. เติม 20% FBS M199 media ลงไปใน well ละ 180 µL และเติมสารตัวอย่างลงไป 20 µL
10. เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง โดยถ่ายรูปที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง