บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตู้อบ memmert western Germany
2. Water bath
3. กระดาษกรอง cellulose acetate
4. บีกเกอร์ขนาด 50, 100,500 และ 1,000 มิลลิลิตร
5. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
7. ปิเปต ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
8. ปากคีบ forceps
9. เครื่องเขย่าสาร (vortex)
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์
11. แท่งแก้วคนสาร
12. ไมโครปิเปต ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
13. ปิเปตเอด
14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
15. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
16. 25 และ 75 cm^3 T-culture flask จำหน่ายโดย Nunclon , Denmark
17. Microculture plate ขนาด 96 และ 6 หลุม จำหน่ายโดย Nunclon , Denmark
18. กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Light microscope)
19. กล้องจุลทรรศน์ชนิดกลับหัว (inverted microscope)
20. Multimode detector
21. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter)

22. Pasture pipette

23. Haemocytometer

สารเคมี

1. Ethanol 95 % จำหน่ายโดยองค์การเภสัชกรรม
2. Dulbecco's Modified Eagel Medium (D-MEM) จำหน่ายโดย Gibco labolatory ประเทศอเมริกา
3. Mycoplasma-Free FCS (Fetal calf Srum) จำหน่ายโดย Gibco labolatory ประเทศอเมริกา
4. Penicillin/Streptomycin mixture (Stock) 10,000 Units/ml จำหน่ายโดย Gibco labolatory ประเทศอเมริกา
5. Fungizone (Amphoteracin B) 250 ug/mlจำหน่ายโดย Gibco labolatoryประเทศอเมริกา
6. N-2-Hydroxythylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid (HEPES) จำหน่ายโดย Sigma chemical company ประเทศอเมริกา
7. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)จำหน่ายโดย Sigma chemical company ประเทศอเมริกา
8. Trypsinizing solution 0.25%(w/v) trypsin/ Versine or Trpson in TD-EDTA buffer จำหน่ายโดย Flow laboratoryประเทศอเมริกา
9. Sodium carbonate (Na_2CO_3)จำหน่ายโดย Sigma chemical companyประเทศอเมริกา
10. Sodium hydroxide (NaOH)จำหน่ายโดย Sigma chemical companyประเทศอเมริกา
11. Sodium chloride (NaCl)จำหน่ายโดย Sigma chemical company ประเทศอเมริกา
12. Potassium chloride (KCl)จำหน่ายโดย Sigma chemical companประเทศอเมริกา
13. Sodium phosphate (Na_2HPO_4)จำหน่ายโดย Sigma chemical companyประเทศอเมริกา
14. Tris-hydroxymethyl-aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)จำหน่ายโดย Sigma chemical company ประเทศอเมริกา
15. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)จำหน่ายโดย Sigma chemical companyประเทศอเมริกา
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO) จำหน่ายโดย Fluka ประเทศเยอรมัน
17. Curcumin จำหน่ายโดย Sigma chemical companyประเทศอเมริกา
18. Caffeic acid จำหน่ายโดย Sigma chemical companyประเทศอเมริกา
19. Mercaptoethanol จำหน่ายโดย Plusone ประเทศสวีเดน

20. Tryphan blue จำหน่ายโดย จำหน่ายโดย Gibco labolatoryประเทศอเมริกา

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1.การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ สารเคมีและน้ำยาต่างๆ

1.1 การเตรียม D-MEM medium

วิธีเตรียม

1.เทผง D-MEM จากซองใส่ภาชนะขนาด 1 ลิตรที่มี deionized distrilled water อยู่ประมาณ 800 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

2. ชั่ง HEPES ปริมาณ3.57 กรัม เติมลงไปคนให้เข้ากัน

3. ชั่ง $NaHCO_3$ ปริมาณ 3.7 กรัม เติมลงไปคนให้เข้ากัน

4. เติม mercaptoethanol จาก stock ลงไป 1 มิลลิลิตรคนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

5. นำสารละลายไปกรองด้วย Suction filter ที่ปราศจากเชื้อแล้ว โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอนจากนั้นแบ่งอาหารใส่ขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตรเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียม Complete medium

วิธีการเตรียม

1. นำ *D-MEM incomplete medium* มา *88* มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร *100* มิลลิตร
2. เติม Pen/Strep 1ml จาก stock(10,000 unit/ml) ลงไปในขวดและเติม fungizone 1 มิลลิตรผสมให้เข้ากัน
3. ดูด FCS ใส่ลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร
4. ใช้ pasture pipette ดูด medium ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน 24 well plate นำไปบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เพื่อตรวจสอบว่า medium ปราศจากเชื้อ

1.3 การเตรียม TD-EDTA buffer pH 7.4

วิธีการเตรียม สำหรับ 500 มิลลิลิตร

1 M *Tris*-Base	12.5	*ml*
1 M NaCl	73.5	ml
100 mM KCl	25.0	ml
352 mM Na_2HPO_4	1.0	ml
100 mM EDTA	0.5	ml
Deionized distilled water	25.0	ml

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 N HCl เติม deionized distilled water ให้ครบ 500 ml นำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอนเก็บไว้ในขวด 500 มิลลิลิตรที่ 4 องศาเซลเซียส

1.4 การเตรียม phosphate buffer saline (PBS)

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง KH_2PO_4 0.24 กรัม Na_2HPO_4 1.44 กรัม, NaCl 8 กรัม และ KCl 0.2 กรัม
2. นำมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
3. นำมาใส่ในขวดแล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ Hep G2

2.1. สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95 % ในบรรยากาศที่มี 5 % CO_2 ทำการ subculture เซลล์ทุกๆ 2 วัน ในทุกขั้นตอนของการทดลองจะต้องเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเชื้อโรคปะปนอยู่ เซลล์ที่เกาะอยู่บนผิวพลาสติกก่อนนำมาทดลองจะต้องทำให้หลุดจากผิวพลาสติกโดยใช้สารละลาย trypsin 0.25 %

2.2. การเลี้ยงเซลล์ Hep G2 cell line

1. เมื่อเซลล์เจริญเติบโต 80-100% confluent ให้ใช้ Pasture-pipette ที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดเอาอาหารเก่าออกให้หมด
2. เติม 0.25% trypsin ใน TD-EDTAเพื่อเซลล์ให้หลุดออกจากกันทิ้งไว้ 1-2 นาที
3. ดูดสารละลาย trypsin ออกให้หมดจากนั้นเติม TD-EDTA ประมาณ 2 มิลลิลิตรดูดกลับไปกลับมาให้เซลล์หลุดออกให้หมด
4. แบ่งเซลล์ใส่ในจานทดลองอันใหม่โดยนำเซลล์จากข้อ 3 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์

2.3. การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการทดลอง

1. เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ให้เก็บเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที
2. ดูดส่วนใสทิ้ง เติม complete medium ใหม่ลงไปอีกผสมให้เข้ากันจากนั้นแบ่งเซลล์มานับด้วย haemocytometer

2.4. การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

1. นำเซลล์ HepG2 ออกจาก culture T-flask ที่มีการเจริญของเซลล์ 70-80% confluent ใส่ในหลอดทดลองนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 *rpm* นาน 5 นาทีดูดส่วนใสทิ้งเติม *complete medium* ใหม่ลงไปใช้ pasture pipette ดูดเบาๆให้เข้ากัน นำไปวัดปริมาณเซลล์
2. ทำการเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น 10^6 cell/ ml นำไปดูดใส่ 96 well plate หลุมละ 100 ul จำนวน 3 หลุม
3. เก็บเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. เติมสารที่มีความเข้มข้นต่างๆกันในช่วง 0.625-100 ug/ml บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก 100 ul
6. เติม สารละลาย MTT dye solution xib,kl 15 ul/well และทำการบ่มเซลล์ต่อที่ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง
7. เมื่อครบเวลาให้คว่ำ 96 well plate เพื่อทิ้งสารละลายออกให้หมด

8. เติม DMSO หลุมละ 100 ul จากนั้นอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm และใช้ค่าความยาวคลื่น 630 nm เป็นตัวอ้างอิง
9. ทำการคำนวณ % survival โดยเทียบกับหลุมควบคุม

3.การศึกษาผลของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์ต่อฮีมออกซีจีเนส

3.1 ผลของ caffeic aicd และอนุพันธ์ ต่อ heme oxygenase1 activity

1. เตรียมเซลล์ Hep G2 ให้มีความเข้มข้น 1x 10^6 cell/ ml ใน 6 well plate แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
2. การทดสอบใช้ caffeic acid และอนุพันธ์ ที่ความเข้มข้น 10 50 และ 100 ug/ml นำไปบ่มกับเซลล์ในข้อ 1 โดยบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาให้ล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง
4. นำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยเติม 0.8% *digitonin* ใน 0.2 M EDTA ปั่นตกตะกอนเซลล์ จากนั้นดูดส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส
5. นำส่วนใสไปหาปริมาณโปรตีนด้วย BSA kit assay

3.2 การวัดระดับโปรตีนในไมโครโซม

เจือจางโปรตีนในไมโครโซมโดยใช้ phosphate buffer pH 7.4 และวัดปริมาณโปรตีนใช้ BCA protein assay reagent kit

ขั้นตอน

1. เตรียมสารมาตรฐานโปรตีน โดยละลายสารมาตรฐานอัลบูมินให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. เติมส่วนผสมของสารละลายระหว่าง BCA ในด่างที่ผสมด้วย sodium carbonate, sodium bicarbonate และ sodium tartarte กับ $CuSO_4$ หรือ reagent A และ B จาก reagent kit ด้วยอัตราส่วน 50:1 (A:B)
3. เติม reagent ลงในหลอด สารมาตรฐานโปรตีน หลอดละ 2 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 30 นาที แล้วอ่านสีม่วงของ BCA-Cu^+ protein complex ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 562 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็นตัวเปรียบเทียบ
4. เจือจางโปรตีนในไมโครโซมด้วยน้ำและนำไปวัดหาระดับ protein เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

3.2 การหา heme oxygenase 1 activity

การหาแอกติวิตีของฮีมออกซีจีเนส 1 หาโดยประยุกต์วิธีของ Motterlini และคณะ (Mottelini et al, 2000) ขั้นตอนมีดังนี้

1. เตรียมสารละลายที่มีความเข้มของส่วนประกอบดังนี้
   - 1 mM NADP
   - 1 mM glucose-6-phosphate
   - 5 mU glucose -6-phosphate dehydrogenase
   - 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.4
   - 1 mg/ml hemin
2. นำสารละลาย 300 µl เติมโปรตีนที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกจำนวน 100 µl แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
3. เติม 0.1 mM NADPH 50 µl เพื่อเริ่มปฏิกิริยาจากนั้นบ่มต่อที่37 องศาเซลเซียสโดยห้ามให้ถูกแสงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3000รอบต่อนาที
5. ดูดส่วนชั้นคลอโรฟอร์มนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 464 และ 530 นาโนเมตร
6. คำนวณหาค่าแอกติวิตีเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1 โดยใช้ค่า $\varepsilon = 10 mM^{-1}cm^{-1}$ ในหน่วย µM/mg protein/ h