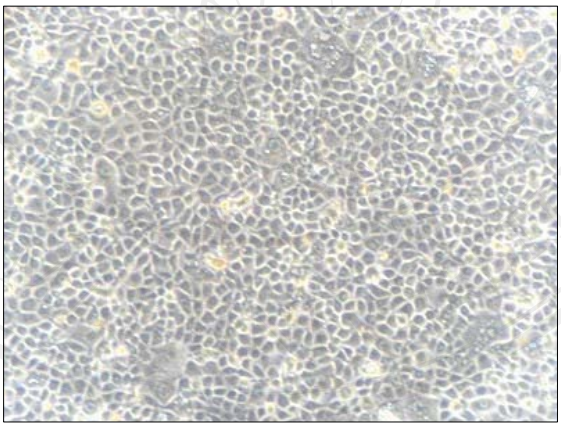
ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก
เซลล์เพาะเลี้ยง

Cell culture คือ เซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เซลล์เหล่านั้นไม่สามารถกลับมาเรียงตัวหรือ organized เป็น tissue ได้อีก โดยจะสูญเสียคุณสมบัติและหน้าที่เดิมของ tissue ไป

Vero cells มีต้นกำเนิดจากเซลล์ไตลิง (African green monkey cercopithecus aethiops kidney cells) จัดเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแบบ established cell lines มีความสามารถเพาะเลี้ยงได้ไม่จำกัดหรือหลายช่วงอายุ (generation) ลักษณะเซลล์แบบ epithelial cell เป็นเซลล์แบบยึดเกาะชั้นเดียว (monolayer) มีจำนวนโครโมโซมเป็น heteroploid เซลล์ประเภทนี้นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการไวรัส (จันทพงษ์ และคณะ, 2530)



ภาพ 29 Vero cells

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อดี

- สามารถใช้เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเจริญเติบโตเร็วและเพาะเลี้ยงได้ง่าย

ข้อเสีย

- ใช้เลี้ยงไวรัสได้เพียงบางชนิด
- มีความผิดปกติทาง chromosome จึงไม่เหมาะในการเลี้ยงไวรัสเพื่อเตรียมเป็นวัคซีน

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นแบบ semi-defined media ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารที่ได้จากธรรมชาติ (ซีรั่ม) และสารสังเคราะห์ อาหารเลี้ยงเซลล์แบ่งเป็น 2 ชนิดตามวัตถุประสงค์ของการใช้ คือ

1. Growth media เป็นอาหารที่มีสารอาหารครบถ้วนเพียงพอที่ทำให้เซลล์เจริญเติบโต ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยให้มีส่วนผสมของซีรั่มในปริมาณค่อนข้างสูง คือ 5-20 %

2. Maintenance media เป็นอาหารที่ใช้เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาวะ steady state หรือ low metabolism นิยมใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัส โดยเซลล์ไม่มีการแบ่งตัว อาจมีส่วนผสมของซีรั่มน้อยหรือไม่มีเลย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

1. Minimum Essential Medium (MEM)

MEM*	9.5	g
$NaHCO_3$	0.8	g
Gentamycin	1000	µl
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1000	ml

ผสม MEM กับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เขย่าให้ละลาย เติม $NaHCO_3$ จึงนำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 µm ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงเติม gentamycin

*MEM มีส่วนประกอบดังนี้
- Earle's Balanced Salts
- 2.0 mM L-glutamine
- without sodium bicarbonate

2. Growth medium

MEM	90 ml
Inactivated serum	10 ml

เตรียมด้วยวิธีไร้เชื้อ โดยผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C

3. Maintenance medium

MEM	20 ml
Inactivated serum	0.4 ml

เตรียมด้วยวิธีไร้เชื้อ โดยผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. Overlay medium

Sodium Carboxy Methylcellulose, 1.5% (W/V)	3.5 ml
Growth medium	10.5 ml
$NaHCO_3$	50 µl

นำส่วนผสมแต่ละส่วนไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{O}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ นำส่วนผสมที่ฆ่าเชื้อแล้วทั้งสามส่วนมาผสมกันก่อนใช้งาน เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C

5. Inactivated serum

นำ bovine calf serum มาทำการ inactivate โดยนำไปแช่ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 56 ^{O}C นาน 30 นาที ครบเวลาแบ่งออกใช้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ส่วน stock ที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

สารเคมีและสีย้อม

1. Phosphate Buffered Saline (PBS, 10X)

NaCl	40	g
KCl	1	g
$NaHCO_3$	5.75	g
KH_2PO_4	1	g
น้ำกลั่น	500	ml

ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 ^{O}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. Trypsin, 1% (W/V)

Trypsin	1	g
PBS, 1X	100	ml

กรองด้วยแผ่นกรองที่มี pore size 0.45 μm เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

3. 1% ethylenediamine tetra- acetic acid (EDTA)

EDTA	1	g
ปรับปริมาตรด้วย PBS (1X)	100	ml

ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 ^{O}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. $NaHCO_3$, 10% (W/V)

$NaHCO_3$	10	g
น้ำกลั่น	100	ml

ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 ^{O}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. Sodium Carboxy Methylcellulose, 1.5% (W/V)

Sodium carboxy methylcellulose	1.5	g
น้ำกลั่น	100	ml

ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 ^{O}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. Crystal Violet, 1% (W/V) ใน 1% ethanol

Crystal violet	1	g
95% Ethanol	10	ml
น้ำกลั่น	990	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

7. Trypsin-EDTA, 1% (W/V)

Trypsin-EDTA, 1% (W/V)	10	ml
EDTA, 1% (W/V)	10	ml
PBS (1X)	80	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C

8. 70% alcohol

95% alcohol	148	ml
น้ำกลั่นเติมจนปริมาตรเป็น	200	ml

9. MTT solution

(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide)	2.0	mg
PBS (1X)	1.0	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรียด้วยแผ่นกรองที่มี pore size ขนาด 0.45 μm เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

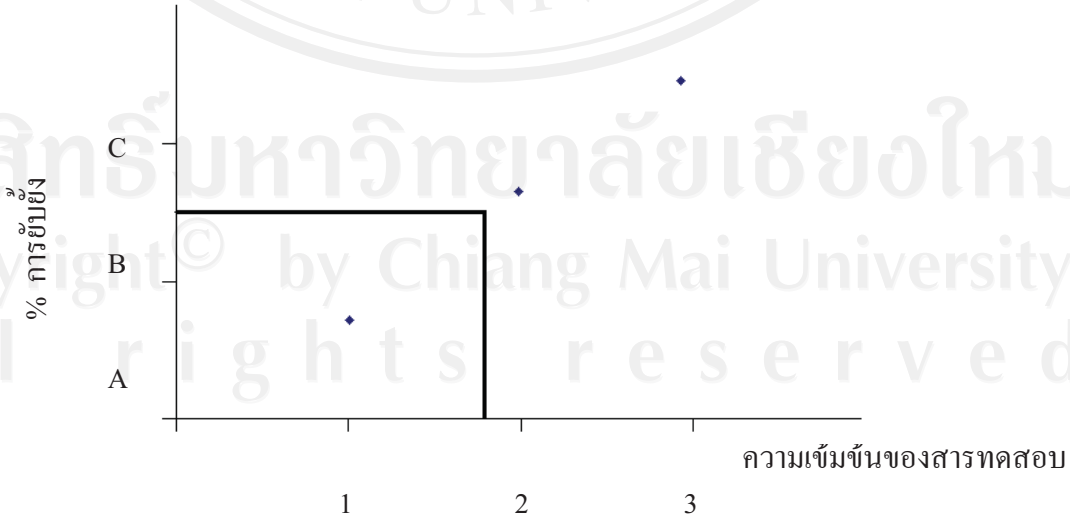
ภาคผนวก ง

การหาค่า 50% inhibition assay (IC_{50}) และ 50% effective dose (ED_{50})

นำค่าการยับยั้งของสารสกัดสาหร่ายหรือยาต้านไวรัส ACV ต่อเชื้อไวรัสก่อโรคเริม (ตาราง 33) มา plot กราฟ (ภาพ 30) โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารทดสอบเป็นแกน X และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็นแกน Y โดยใช้โปรแกรม excel จากนั้นหาค่าความชันของกราฟเส้นตรงโดยแทนค่าในสมการ Y = mX + c ซึ่งค่า m คือ ความชันของกราฟ ค่า Y คือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการติดเชื้อไวรัส ดังนั้นเมื่อต้องการหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการติดเชื้อไวรัสได้ 50% (ค่า X) ซึ่งหมายถึงค่าการยับยั้ง (Inhibition dose) ที่ 50% เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสด้วยยาต้านไวรัส ACV หรือค่า Effective dose ที่ 50% เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสด้วยสารสกัดสาหร่าย โดยแทนค่า Y เท่ากับ 50

ตาราง 33 ค่าการยับยั้งของสารสกัดสาหร่ายหรือยาต้านไวรัส ACV ต่อเชื้อไวรัสก่อโรคเริม

ความเข้นข้นของสารทดสอบ	% การยับยั้ง
1	A
2	B
3	C



ภาพ 30 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวเชิญขวัญ พื้นดี
วัน เดือน ปีเกิด	20 กุมภาพันธ์ 2529
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนารีรัตน์ จังหวัดแพร่ ปีการศึกษา 2546 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2550
ประสบการณ์	1. เสนอผลงานทางวิชาการรูปแบบโปสเตอร์ ในงานการประชุมวิชาการสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ครั้งที่33 ประจำปี 2552 2. เสนอผลงานทางวิชาการรูปแบบโปสเตอร์ ในงาน The 21st Annual Meeting and International Conference of The Thai Society for Biotechnology 2009

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved