บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. กรวยแก้ว (funnel)
2. กระดาษกรอง Whatman No.1
3. กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 ml
4. ขวดฝาสีดำขนาด 15 และ 30 ml
5. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 และ 75 cm^2
6. ขวด Duran ขนาด 250 500 และ 1,000 ml
7. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม
8. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม
9. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม
10. ช้อนตักสาร
11. ถุงมือยาง
12. บีกเกอร์ขนาด 250 และ 500 ml
13. ปากคีบ (forcep)
14. ปิเปตแก้วขนาด 5 และ 10 ml
15. ผ้าขาวบาง
16. แผ่นกรองขนาด 0.22 μm
17. สำลี
18. อะลูมิเนียมฟอยล์
19. อุปกรณ์กรองอาหารเลี้ยงเซลล์
20. Freezer box
21. Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ml
22. Pipette tip ขนาด 200 และ 1,000 μl
23. parafilm (laboratory film)
24. Vacuum pump

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) (Olympus, CKX41)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus, ARC 120)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, AB304-S)
4. ตู้แช่แข็ง -20 °C (Sanyo, SF-C991 NG) และ -80 °C (Sanyo, MPF-392)
5. ตู้ถ่ายเชื้อ (biosafety Cabinet Class II) (ESCO)
6. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) (Shellab, 2323-2)
7. ตู้เย็น (LFS)
8. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) (Tomy, SS-325)
9. Automatic pipette 0.5-1000 ml (Biohit)
10. Pipette boy (TECNOMARA)
11. Rocking platform (ELMI, S 4)
12. Rotary evaporator (BUCHI)
13. Vortex mixer (Gemmy Industrial Copp., VM-300)
14. Water bath (Memmert, WB-10)

เชื้อจุลินทรีย์

1. ไวรัสก่อโรคเริมสายพันธุ์มาตรฐาน ได้รับความอนุเคราะห์จากแขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
   1.1 เชื้อ Herpes simplex virus type 1 สายพันธุ์ F (HSV-1F)
   1.2 เชื้อ Herpes simplex virus type 2 สายพันธุ์ G (HSV-2G)
2. ไวรัสก่อโรคเริมที่ดื้อต่อยาต้านไวรัสอะไซโคลเวียร์ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า (AFRIM)
   2.1 เชื้อ Herpes simplex virus type 1 ตัวอย่างหมายเลข 5
   2.2 เชื้อ Herpes simplex virus type 1 ตัวอย่างหมายเลข 22
   2.3 เชื้อ Herpes simplex virus type 2 ตัวอย่างหมายเลข 2

เซลล์เพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ก)

Vero cells ได้รับความอนุเคราะห์จากแขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยาที่ใช้ทดสอบในการต้านเชื้อไวรัส

Acyclovir [acycloguanosine, 9-2-(hydroxyethoxy methyl) guanine] บริษัท SIGMA-Aldrich CHEMIE Gmbh Co.Po., Germany

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่าย *Spirulina platensis* ชนิดผง ได้รับความอนุเคราะห์จากบุญสมฟาร์ม อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่

อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาคผนวก ข)

1. Growth medium (GMEM)
2. Inactivated serum
3. Maintenance medium
4. Minimum Essential Medium (MEM)
5. Overlay medium

สารเคมีและสีย้อม (ภาคผนวก ค)

1. Crystal violet ใน 1% ethanol, 0.1%
2. Dimethyl sulphoxide (DMSO)
3. EDTA, 1% (W/V)
4. Ethanol, 70% และ 95%
5. $NaHCO_3$, 10% (W/V)
6. Phosphate Buffer Saline (PBS)
7. Sodium Carboxy Methylcellulose, 1.5% (W/V)
8. Trypsin, 1% (W/V)
9. Trypsin-EDTA, 1% (W/V)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยง Vero cell

1.1 ทำการ subculture เซลล์ โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงเจริญเติมพื้นที่ผิวขวด และล้างผิวเซลล์โดย PBS (1X) 2 ครั้ง

1.2 เติม 0.1% Trypsin – EDTA 0.3 - 0.5 ml ทิ้งไว้จนเซลล์แยกตัวออกจากกัน จากนั้นเท 0.1% Trypsin – EDTA ทิ้ง

1.3 เติม growth medium 1.5 ml แล้วทำการดูดปล่อยอาหาร เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ และทำให้เซลล์แยกตัวกระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

1.4 แบ่งเซลล์ใส่ขวดใหม่ โดยใช้อัตราส่วนในการแบ่งเซลล์เท่ากับ 1 : 3 หรือ 1:4 จากนั้นเติม growth medium ให้ครบ 5 ml

1.5 นำเซลล์ไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 2 – 3 วัน โดยสังเกตการเจริญเติบโตด้วย Inverted microscope เมื่อเซลล์เจริญเป็น monolayer เต็มพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง นำไป subculture ต่อไปตามวิธีข้างต้นด้วยวิธีปลอดเชื้อ

2. การเพาะเลี้ยง Vero cell ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม

2.1 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก จากนั้นล้างเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญเต็มพื้นที่ผิวขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 ด้วย PBS(1X) 2 ครั้ง

2.2 เติม 0.1% Trypsin – EDTA 0.3 – 0.5 ml ทิ้งไว้สักครู่ จนเซลล์แยกตัวออกจากกัน แล้วจึงเท 0.1% Trypsin – EDTA ทิ้ง

2.3 เติม growth medium และทำการดูดปล่อยจนเซลล์หลุดจากพื้นผิวขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์จนครบ 16 ml เพื่อให้มีปริมาณเซลล์ $3x10^5$ cells/ml

2.4 ดูดเซลล์จากขวดเพาะเลี้ยง และเติมลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุมๆ ละ 2.5 ml แล้วเขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วหลุม

2.5 นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลาประมาณ 3 – 4 วัน จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวของแต่ละหลุม และตรวจการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยกล้อง Inverted microscope

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเพาะเลี้ยง Vero cell ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม

3.1 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก จากนั้นล้างเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญเต็มพื้นที่ผิวขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 ด้วย PBS(1X) 2 ครั้ง

3.2 เติม 0.1% Trypsin-EDTA 0.3-0.5 ml ทิ้งไว้สักครู่ จนเซลล์แยกตัวออกจากกัน แล้วจึงเท 0.1% Trypsin-EDTA ทิ้ง

3.3 เติม growth medium และทำการดูดปล่อยจนเซลล์หลุดจากพื้นผิวขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์จนครบ 16 ml เพื่อให้มีปริมาณเซลล์ $3x10^5$ cells/ml

3.4 ดูดเซลล์จากขวดเพาะเลี้ยง และเติมลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุมๆ ละ 500 µl แล้วเขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วหลุม

3.5 นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลาประมาณ 2-3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวของแต่ละหลุม และตรวจการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยกล้อง Inverted microscope

4. การเพิ่มปริมาณไวรัส

4.1 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงเจริญเต็มพื้นผิว โดยให้เหลืออาหารในขวดเพาะเลี้ยง 1 ml

4.2 เติมไวรัสจาก stock 100 µl เขย่าโดยใช้ rocking platform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์ เมื่อครบเวลา เทไวรัสส่วนเกินทิ้งไป

4.3 เติม Maintenance medium 2 - 3 ml แล้วนำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 2 - 3 วัน

4.4 สังเกตการเกิด Cytopathic effect (CPE) ด้วยกล้อง Inverted microscope จนกระทั่งเซลล์ติดเชื้อทั้งหมดคือ CPE = 4+

4.5 ทำการเก็บไวรัสโดยนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสไปแช่แข็งที่ -80 ^{O}C และนำมาทำการละลายอย่างรวดเร็ว นำกลับไปแช่แข็งที่ -80 ^{O}C และทำการละลายใหม่อีกครั้ง เพื่อให้เซลล์แตก และเก็บไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ -80 ^{O}C เพื่อเก็บเป็น stock ไวรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การตรวจหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay

5.1 นำเซลล์ที่เจริญเต็มหลุมจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม หาปริมาณไวรัส โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมจนเหลืออาหารในหลุม 200 µl

5.2 เจือจางไวรัสจาก stock โดยเจือจางแบบ 10 เท่าลำดับส่วน ตั้งแต่ $1:10 - 1:10^6$

5.3 เติมไวรัสแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม หลุม ละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่อง rocking platform เพื่อให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์

5.4 เติม overlay medium ลงในทุกหลุมๆ ละ 400 µl นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลาประมาณ 3 – 4 วัน

5.5 ดูด medium แต่ละหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS(1X) 1 ครั้ง ประมาณ 200 µl ทุกหลุม และย้อมสีเซลล์ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ใน 1% ethanol โดยหยดลงในแต่ละหลุม ประมาณ 3 – 4 หยดให้ท่วมเซลล์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 – 20 นาที แล้วดูดสีย้อมทิ้ง

5.6 ตรวจดูการติดสีย้อมของเซลล์ติดเชื้อ และนับปริมาณ plaque ซึ่งเป็นบริเวณของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและไม่ติดสีย้อม แล้วทำการคำนวณหาปริมาณไวรัส โดยมีหน่วยเป็น plaque forming unit /ml (PFU/ml)

6. การเตรียมยา acyclovir เพื่อทดสอบกับไวรัส

ชั่ง acyclovir 0.1 mg ผสมลงในน้ำกลั่นไร้เชื้อ 1 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่ -20 ^{O}C

7. การเตรียมสารสกัดสาหร่าย

7.1 สกัดสาหร่าย *S. platensis* ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ใช้อัตราส่วนน้ำหนักแห้งของสาหร่ายต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 : 10 โดยแบ่งตัวทำละลายออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มแรก สกัดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยแช่ภาชนะลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 45 ^{O}C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

กลุ่มสอง สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล แช่ทิ้งไว้ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการเขย่าระหว่างทำการสกัดเป็นระยะ

7.2 นำตัวอย่างที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 และนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ระเหยตัวทำละลายออกแล้วไปทำให้แห้งโดยเครื่อง lyophilizer

7.3 ชั่งน้ำหนักแห้งและเตรียมสารสกัดเริ่มต้น โดยนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย Dimethyl sulphoxide (DMSO) และเก็บสารสกัดไว้ที่ 4 ^{O}C ในขวดสีชา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสาหร่ายต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยวิธี MTT assay (Mosmann., 1983)

8.1 นำ stock สารสกัดสาหร่ายมาเจือจางด้วย Minimum Essential Medium (MEM) แบบ 2 เท่าลำดับส่วน ตั้งแต่ 1 : 2 – 1 : 2^{12}

8.2 เติมสารสกัดสาหร่ายแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงเจริญเต็มพื้นผิว หลุมละ 100 µl โดยเติมความเจือจางละ 4 หลุม และเติม MEM ลงในหลุมควบคุม นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

8.3 ดูด medium ในหลุมทิ้ง เติม MTT solution ลงทุกหลุม หลุมละ 15 µl นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน CO_2 incubator เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง

8.4 ดูดสารละลาย MTT ในหลุมทิ้ง เติม DMSO ลงทุกหลุม หลุมละ 200 µl

8.5 นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 630 nm โดยเครื่อง microplate reader แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา 50% cytotoxicity dose (CD_{50})

9. การทดสอบสารสกัดในการยับยั้งเชื้อ HSV โดยวิธี plaque reduction assay

9.1 การยับยั้งเชื้อ HSV เมื่อเติมสารสกัดสาหร่ายก่อนไวรัสเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยง

9.1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว โดยตรวจดูด้วยกล้อง Inverted microscope

9.1.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว ทิ้งไป หลุมละ 300 µl

9.1.3 เติมสารสกัดสาหร่าย *S. platensis* ที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ลงในหลุมที่ต้องการทดสอบ ปริมาณ 200 µl เติม MEM ลงในหลุมไวรัสควบคุม ปริมาณ 200 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่อง rocking platform

9.1.4 เติมไวรัสก่อโรคเริม 100 µl ในทุกหลุมของจานเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง บนเครื่อง rocking platform

9.1.5 เติม overlay medium ทุกหลุมๆ ละ 300 µl นำไปบ่มที่ 37^{O}Cใน CO_2 incubator เป็น เวลา 3 – 4 วัน

9.1.6 ย้อมสีเซลล์ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ใน 1% ethanol เพื่อตรวจดูการติดสีย้อมของเซลล์ติดเชื้อ และนับปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบกับสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อไวรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9.2 การยับยั้งเชื้อ HSV เมื่อเติมสารสกัดสาหร่ายขณะไวรัสเกาะติดเซลล์

9.2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว โดยตรวจดูด้วยกล้อง Inverted microscope

9.2.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว ทิ้งไป หลุมละ 300 µl

9.2.3 เติมไวรัส ก่อโรคเริมปริมาณ 100 µl ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วเติมสารสกัด สาหร่ายที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลงในหลุมทดสอบปริมาณ 200 µl และเติม MEM ลงในหลุมไวรัสควบคุมปริมาณ 200 µl บ่มบน rocking platform ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

9.2.4 เติม overlay medium ทุกหลุมๆ ละ 300 µl นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน CO_2 incubator เป็น เวลา 3 – 4 วัน

9.2.5 ย้อมสีเซลล์ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ใน 1% ethanol เพื่อตรวจดูการติดสีย้อมของเซลล์ติดเชื้อ และนับปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบกับสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อไวรัส

9.3 การยับยั้งเชื้อ HSV เมื่อเติมสารสกัดสาหร่ายหลังจากไวรัสเกาะติดเซลล์

9.3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว โดยตรวจดูด้วยกล้อง Inverted microscope

9.3.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวทิ้งไป หลุมละ 300 µl

9.3.3 เติมไวรัสก่อโรคเริมปริมาณ 100 µl ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ เขย่าเบาๆ บ่มบน rocking platform ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน rocking platform

9.3.4 เติมสารสกัดสาหร่ายที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลงในหลุมทดสอบปริมาณ 200 µl และเติม MEM ลงในหลุมไวรัสควบคุมปริมาณ 200 µl

9.3.5 เติม overlay medium ทุกหลุมๆ ละ 300 µl นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 3 – 4 วัน

9.3.6 ย้อมสีเซลล์ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ใน 1% ethanol เพื่อตรวจดูการติดสีย้อมของเซลล์ติดเชื้อ และนับปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบกับสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อไวรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10. การทดสอบสารสกัดสาหร่ายในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมโดยตรง

10.1 ผสมสารสกัดสาหร่ายที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 400 µl กับไวรัส 400 µl ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

10.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

10.3 นำส่วนผสมในแต่ละเวลาไปหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay ตามวิธีดังข้อ 5 และคำนวณหาปริมาณไวรัสที่ลดลง ที่เวลาทดสอบเดียวกัน

11. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่ายในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมที่ระยะเวลาต่างๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง

11.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุมจนเจริญเต็มพื้นผิว โดยตรวจดูด้วยกล้อง Inverted microscope

11.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวทิ้งไป โดยให้เหลืออาหารเลี้ยงเซลล์เดิมในหลุมเพียงหลุมละ 1 ml

11.3 เติมไวรัสปริมาณ 1 x 10^6 PFU/ml ลงในทุกหลุม บ่มบนเครื่อง rocking platform ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

11.4 ดูดไวรัสส่วนเกินทิ้งไป ล้างเซลล์ด้วย PBS(1X) 2 ครั้ง

11.5 เติม MEM ปริมาณ 1 ml ในกลุ่มไวรัสควบคุม (negative control) เติมสารสกัดสาหร่ายที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปริมาณ 1 ml ในกลุ่มทดสอบ และเติมยาต้านไวรัส acyclovir ความเข้มข้นซึ่งยับยั้งเชื้อ HSV ได้ 50% ปริมาณ 1 ml ในกลุ่มยาควบคุม (positive control)

11.6 นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 0, 6, 12, 24 และ 30 ชั่วโมง เก็บไวรัสภายหลังการติดเชื้อ ณ เวลาต่างๆ ที่ตู้ -80 ^{O}C

11.7 ตรวจสอบผลการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโดยสารสกัดและยาต้านไวรัสเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสควบคุม ณ เวลาต่างๆ โดยวิธี plaque titration assay ตามวิธีดังข้อ 5 และคำนวณหาปริมาณไวรัสที่ลดลงของแต่ละชั่วโมงทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved