

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาวัฏจักรเซลล์ของเซลล์เชื้อสาย 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกคือ HeLa เซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดมี 2 เชื้อสายคือ A-549 และ NCI-H1299 โดยประเมินจากขนาดของนิวเคลียสของเซลล์ที่เกาะอยู่บนพื้นขวดเลี้ยง (adherent) และที่ทำให้หลุดออกมาเป็นเซลล์ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (suspension) การวิจัยประกอบด้วยการขึ้นตอนทั้งหมด 4 ขั้นตอน คือ (3.1) การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ (3.2) การศึกษาวัฏจักรเซลล์ในสภาวะปกติ (ไม่ได้รับสารพิษใดๆ) (3.3) การศึกษาวัฏจักรเซลล์หลังจากได้รับ cisplatin และ (3.4) การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์หลังได้รับ cisplatin ทั้งนี้ยังมีการรวบรวมกระบวนการที่เป็นวิธีการโดยทั่วไปซึ่งเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ไว้ในหัวข้อ (3.5) วิธีการทางห้องปฏิบัติการทั่วไป และนอกจากนี้ยังได้จัดทำสื่อการสอน (3.6) เพื่อนำผลจากการวิจัยบางส่วนไปใช้ประโยชน์ในด้านการเรียนการสอนในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายต่อไป

อุปกรณ์และสารเคมีพร้อมทั้งรายละเอียดได้รวบรวมไว้ในภาคผนวก ก

3.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์

ขั้นตอนการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ทั้ง 3 เชื้อสายซึ่งอยู่ในสภาวะมาตรฐานของการเลี้ยง (ดู 3.5.1) ทั้งในสถานะที่เซลล์มีการยึดเกาะกับพื้นผิวและสถานะที่เซลล์ลอยหลังจากการทำ trypsinization (ในการทดลองนี้หากกล่าวถึงสถานะเซลล์ลอยจะหมายถึง สถานะที่เซลล์เป็นอิสระจากการเกาะและหลุดออกจากพื้นภาชนะหลังจากการ trypsinization ในลักษณะ suspension) นอกจากนี้ยังมีการย้อมเซลล์ทั้งสองสถานะด้วยสี aceto-orcein เพื่อให้สามารถเห็นสัณฐานของเซลล์ได้ชัดเจนมากขึ้น

- 3.1.1 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละเชื้อสายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม ตามวิธีในข้อ 3.5.1 เป็นการเพาะเลี้ยงก่อนการใช้งาน ซึ่งจะได้เซลล์จำนวนมากในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 cm^2
- 3.1.2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึงระยะ subconfluent จึงทำการ trypsinization ตามวิธีในข้อ 3.5.2 ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวดเลี้ยง

- 3.1.3 นับเซลล์โดยใช้ hemocytometer โดยนำเซลล์ที่ได้จากการ trypsinization มานับแล้วคำนวณจำนวนเซลล์ (ภาคผนวก ค ข้อ 2) จะทำให้ทราบจำนวนเซลล์ใน 1 ml
- 3.1.4 ทำการเจือจางเซลล์โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้จำนวนตามที่ต้องการ ซึ่งในแต่ละเซลล์เชื้อสายอาจแตกต่างกันไป ซึ่งในการทดลองนี้ใช้จำนวนเซลล์ที่ได้มีการรายงานมาแล้วดังนี้ HeLa 70,000 cell/ml (เบญจวรรณ, 2554), A-549 70,000 cell/ml (ไพบุลย์, 2554) และ NCI-H1299 50,000 cell/ml (วลัยลักษณ์, 2554) ซึ่งจำนวนเซลล์ดังกล่าวได้มี การทดลองมาแล้วว่า เป็นจำนวนที่เมื่อเพาะเลี้ยงครบเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ โดยไม่ได้รับผลของการแตะหยุด (contact inhibition) และในขณะเดียวกัน ก็ไม่ได้รับผลจากการหยุดชะงักการเจริญเนื่องจากเซลล์อยู่ห่างกันมากเกินไป (paracrine effect)
- 3.1.5 ใส่เซลล์แต่ละชนิดลงในจานเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 mm จานละ 1 ml. ซึ่งภายในจานมีแผ่น cover slips ชนิดกลมจำนวน 3 แผ่น
- 3.1.6 ค่อยๆ เขย่าเบาๆ ในแนวระนาบหรืออาจใช้ pasture pipette ดูดเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วทั้งจานเลี้ยง และตรวจสอบดูว่าแผ่น cover slips ติดอยู่กับพื้นจานจนสนิท ไม่ลอยขึ้นมา
- 3.1.7 บ่มเซลล์ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะมาตรฐาน (ดูข้อ 3.5.1) เพื่อให้เซลล์ลงเกาะบนแผ่น cover slips
- 3.1.8 นำเซลล์ที่เกาะบน cover slips มาถ่ายภาพเซลล์สดมีชีวิตตามวิธีข้อ 3.5.4 โดยทำ cover slips ละ 1 ภาพ ดังนั้น เซลล์แต่ละเชื้อสายมีจำนวน 3 ภาพ นำมาเปรียบเทียบกันเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ในสถานะเกาะ
- 3.1.9 นำ cover slips ออกจากจานเลี้ยงและทำการย้อมเซลล์ที่เกาะบน cover slips ด้วยสี aceto-orcein ซึ่งได้อธิบายในข้อ 3.5.3 และนำไปถ่ายภาพตามวิธีในข้อ 3.5.4 เช่นเดียวกับข้อ 3.1.8 เพื่อนำภาพไปศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์สถานะเกาะที่ย้อมสีให้เห็นนิวเคลียสภายใน
- 3.1.10 ในจานเลี้ยงจากข้อ 3.1.9 หลังจากนำเอา cover slips ออกไปแล้ว มีเซลล์ที่เหลือเกาะอยู่บนพื้นจานเลี้ยงจำนวนมาก ได้ทำการ trypsinization ตามวิธีในข้อ 3.5.2 และนำเซลล์ที่หลุดออกจากการเกาะทั้งหมดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. เพื่อให้เซลล์มีความเข้มข้นมากขึ้น ทำให้ง่ายต่อการถ่ายภาพ

- 3.1.11 ดูเซลล์ที่มีความเข้มข้นในสถานะลอย suspension ปริมาณ 50 μ l. หยดลงบนกระจกสไลด์และปิดด้วย cover slips จากนั้นนำไปถ่ายภาพตามวิธีการเดียวกับข้อ 3.1.8 เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์มีชีวิตในสถานะเซลล์ลอยเป็น suspension
- 3.1.12 เซลล์ที่เหลือใน microcentrifuge tube นำไปย้อมสี aceto-orcein ตามวิธีการในข้อ 3.5.3.2
- 3.1.13 นำเซลล์ที่ย้อมสีแล้วมาหยดลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วย cover slips แล้วจึงนำไปถ่ายภาพตามวิธีในข้อ 3.5.4 เพื่อนำภาพไปศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์และนิวเคลียสในสถานะเซลล์ลอยและย้อมสี aceto-orcein

3.2 การศึกษาวัฏจักรเซลล์ในสภาวะปกติ

การทดลองในขั้นตอนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์ในสภาวะปกติซึ่งทำการเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง และเก็บข้อมูลสำหรับใช้เป็นกลุ่มควบคุมในงานวิจัยนี้ โดยการทดลองในหัวข้อนี้ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ (3.2.1) การเตรียมเซลล์เพื่อวัดขนาดนิวเคลียส และ (3.2.2) การจัดจำแนกเซลล์ในวัฏจักรเซลล์

- 3.2.1 การเตรียมเซลล์เพื่อวัดขนาดนิวเคลียส ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้
- เตรียมเซลล์แต่ละเชื้อสายทำเหมือนขั้นตอนที่ 3.1.1-3.1.4 จะได้เซลล์ในสถานะลอย
 - เตรียมจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 3.5 มม. ที่ใส่ cover slips ไว้จานละ 3 แผ่น โดยให้มีจำนวน 3 จาน สำหรับเซลล์แต่ละเชื้อสาย แต่ละจานจึงเป็นเสมือนหน่วยการทดลองแต่ละซ้ำ รวม 3 ซ้ำ (replicate)
 - ใส่เซลล์แต่ละชนิดลงในจานทั้ง 3 จาน จานละ 1 ml. จากนั้นทำเหมือนขั้นตอน 3.1.6 – 3.1.7
 - เมื่อครบการบ่มเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำตามวิธีการข้อ 3.1.9 เพื่อนำภาพของเซลล์เกาะที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein ไปทำการวัดขนาดของนิวเคลียสและคำนวณพื้นที่นิวเคลียส ตามวิธีการข้อ 3.5.5 โดยแต่ละชนิดของเซลล์ใช้จำนวนเซลล์ที่นับได้จากภาพถ่ายจำนวนประมาณ 400 เซลล์
 - เรียงข้อมูลพื้นที่นิวเคลียสจากน้อยไปหามาก แล้วทำการแจกแจงว่าในแต่ละความถี่ของพื้นที่นิวเคลียสมีจำนวนกี่เซลล์ จากนั้นนำไปสร้างกราฟการกระจายของจำนวนเซลล์ตามพื้นที่นิวเคลียส

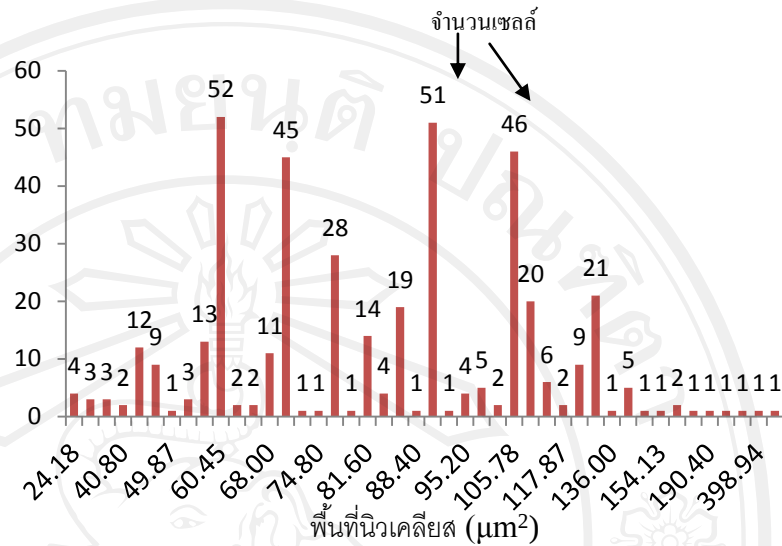
- จ. เมื่อนำ cover slips ออกจากจานเลี้ยงเซลล์ในข้อ ค ไปใช้งาน หยอดแล้ว บนพื้นจานเลี้ยงจะมีเซลล์เหลือเกาะอยู่จำนวนมาก ได้ทำกระบวนการเตรียมเซลล์ลอยเหมือนกับวิธีการข้อ 3.1.10 และนำเซลล์ลอยที่ได้ไปย้อมสี aceto-orcein ตามวิธีการข้อ 3.5.3.2
- ช. ทำเหมือนกับข้อ 3.1.13 โดยจะได้ภาพถ่ายเซลล์ลอยที่ย้อมสี aceto-orcein โดยเซลล์แต่ละชนิดใช้จำนวนประมาณ 400 เซลล์
- ซ. จัดเรียงข้อมูลพื้นที่นิวเคลียสของเซลล์ลอยที่ได้เช่นเดียวกับที่ได้ทำกับเซลล์เกาะในข้อ จ.

3.2.2 การจัดจำแนกเซลล์ในวัฏจักรเซลล์

ในการจัดจำแนกเซลล์นั้นจะเหมือนกันทั้งเซลล์ในสถานะเกาะและลอย โดยเปรียบเทียบข้อมูลกับวิธี flow cytometry ซึ่งอ้างอิงมาจากงานวิจัยอื่นที่ใช้เซลล์เชื้อสายเดียวกัน ซึ่งข้อมูลนั้นจะเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะ G1, S และ G2 ของวัฏจักรเซลล์จากนั้นจึงนำค่าร้อยละนั้น มาคิดให้เป็นจำนวนเซลล์ในระยะต่างๆ และนำมาเทียบกับค่าที่ได้จากการนับ เพื่อทำการจัดวัฏจักรของเซลล์ ซึ่งวิธีการโดยละเอียดมีดังต่อไปนี้

- ก. ทำการเรียงข้อมูลขนาดนิวเคลียสจากเล็กไปหาใหญ่ ต่อจากนั้นสร้างกราฟการกระจายของเซลล์ตามพื้นที่นิวเคลียส
- ข. จัดเซลล์ให้อยู่ในระยะ G1, S และ G2 โดยอ้างอิงจากข้อมูลที่ได้จากวิธี flow cytometry ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีค่าระยะต่างๆ เป็นร้อยละ จากนั้นทำตามวิธี ดังนี้

(ข.1) คำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ทำการนับ โดยนำจำนวนเซลล์ที่กระจายแต่ละแท่งมาบวกกัน



ตัวเลขบนยอดกราฟนำมารวมกันเป็นจำนวนเซลล์ทั้งหมด
= 421 เซลล์

(ข.2) นำข้อมูลจากวิธี flow cytometry ซึ่งเป็นร้อยละมาคำนวณให้เป็นจำนวนเซลล์ที่ระยะโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ในระยะเวลาต่างๆ} = \frac{\text{ร้อยละของเซลล์จาก flow cytometry} \times \text{จำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด}}{100}$$

ตัวอย่าง เช่น

- เซลล์ที่อยู่ในระยะ G1 จากงานวิจัยอื่นมีร้อยละ 68.35

- มีเซลล์ที่ทำการนับทั้งหมด 421 เซลล์

คำนวณได้ ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{จำนวนเซลล์ในระยะเวลาต่างๆ} &= (68.35 \times 421) / 100 \\ &= 287.75 \text{ เซลล์} \end{aligned}$$

Frequency distribution of particle size (G1 = 282 เซลล์) for the 282 cell line. The x-axis represents particle size in μm^2 and the y-axis represents frequency.

Particle Size (μm^2)	Frequency
24.18	4
36.27	3
45.33	12
49.87	9
54.40	52
63.47	13
68.00	2
74.05	45
75.56	11
81.60	28
84.62	14
90.67	19
95.20	1
98.22	46
108.80	20
117.87	6
126.93	21
145.07	9
154.13	1
169.25	5
211.56	1
398.94	1

ก. ทำข้อ ก และ ข กับข้อมูลทั้งสามซ้ำ แล้วจึงนำขนาดนิวเคลียสมาหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) จะได้ขนาดเฉลี่ยของนิวเคลียสในระยะ G1, S และ G2 และทราบว่าในระยะต่างๆ มีจำนวนเซลล์เท่าใด

ง. คำนวณจำนวนเซลล์ในระยะต่างๆ ออกเป็นอัตราส่วนร้อยละ แล้วนำไปสร้างกราฟการกระจายแบบวงกลม เพื่อแสดงการกระจายของเซลล์ในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์

3.3 การศึกษาวัฏจักรเซลล์หลังจากได้รับ cisplatin

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวัฏจักรเซลล์และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ หลังจากได้รับ cisplatin ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 20 หรือ IC_{20} เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ หมายถึง ความสามารถยับยั้งไม่ให้เซลล์มีการแบ่งตัวภายใน 72 ชั่วโมง ซึ่งโดยปกติเซลล์จะแบ่งตัวได้ประมาณ 2-3 รอบ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน เช่นเดียวกับข้อที่ 3.2 คือ การเตรียมเซลล์เพื่อวัดขนาดนิวเคลียส และการจัดจำแนกเซลล์ในวัฏจักรเซลล์

3.3.1 การเตรียมเซลล์เพื่อวัดขนาดนิวเคลียส

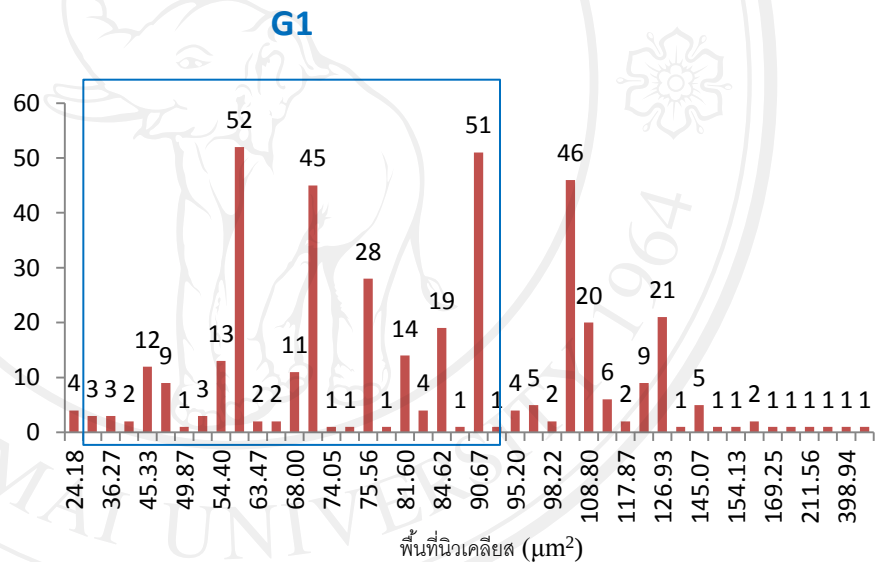
- ก. ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3.2.1 ก-ค
- ข. หลังจากนั้นบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบใช้ pipette ดูดอาหารเลี้ยงเก่าออก และเติมอาหารที่มีสาร cisplatin ลงไป โดยใช้ cisplatin ที่ IC_{20} แก่เซลล์แต่ละเชื้อสาย ซึ่งจะมีค่าแตกต่างกันไป โดยอ้างอิงความเข้มข้นค่า IC_{20} จากของการทดลองอื่น ในเซลล์ทั้งสามเชื้อสาย ซึ่งมีค่าดังนี้ เซลล์ HeLa ใช้ 0.83 $\mu\text{g/ml}$ (เบญจวรรณ, 2554), เซลล์ A-549 ใช้ 0.32 $\mu\text{g/ml}$ (ไพบุณย์, 2554) และ เซลล์ NCI-H1299 ใช้ 3.0 $\mu\text{g/ml}$ (วลัยลักษณ์, 2554)
- ค. ทำการเพาะเลี้ยงต่อจนครบเวลา 72 ชั่วโมง ต่อมานำ cover slips ออกจากจานเลี้ยงและมาข้อมด้วยสี aceto-orcein ดังข้อ 3.5.3 และถ่ายภาพตามข้อ 3.5.4 ตามลำดับ
- ง. นำภาพถ่ายที่ได้มาวัดขนาดของนิวเคลียสและคำนวณพื้นที่นิวเคลียส ตามวิธีการข้อ 3.5.5
- จ. เมื่อได้ข้อมูลพื้นที่นิวเคลียสแล้ว ทำเหมือนขั้นตอนที่ 3.2.1 จ-ซ

3.3.2 การจัดจำแนกเซลล์ในวัฏจักรเซลล์

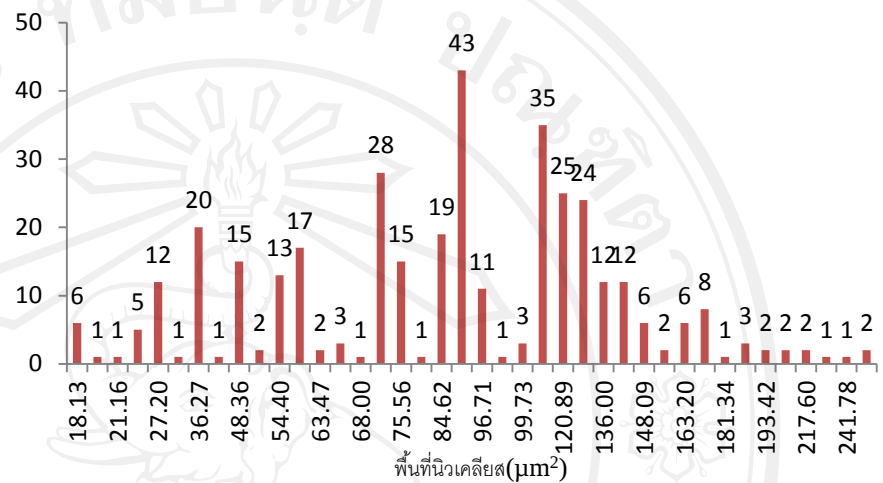
เมื่อทำการกำหนดช่วงของขนาดนิวเคลียสของเซลล์ในสภาวะปกติ โดยใช้ข้อมูลร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ได้จากการทำ flow cytometry จากการอ้างอิงงานวิจัยที่เลือกมาแล้ว จะทำให้ทราบว่าเซลล์แต่ละเชื้อสายที่อยู่ในวัฏจักรเซลล์ทั้ง 3 ระยะ คือ G1, S และ G2 ควรจะมีขนาดนิวเคลียสเท่าใด ช่วงขนาดของนิวเคลียสของเซลล์ทั้ง 3 ช่วงนี้จะถูกนำมากำหนดเป็นช่วงขนาดนิวเคลียสมมาตรฐานของเซลล์แต่ละเชื้อสาย เพื่อนำไปเทียบกับชุดข้อมูลของขนาดนิวเคลียสของเซลล์เชื้อ

สายนั้นๆ หลังจากได้รับสาร cisplatin ไปแล้ว ซึ่งจะทำให้ทราบว่า ช่วงขนาดของนิวเคลียสของแต่ละชั้นในวัฏจักรเซลล์มีร้อยละของจำนวนเซลล์เปลี่ยนแปลงอย่างไร ดังตัวอย่างที่แสดงเกี่ยวเนื่องกับวิธีการข้อ 3.2.2 (ข.3)

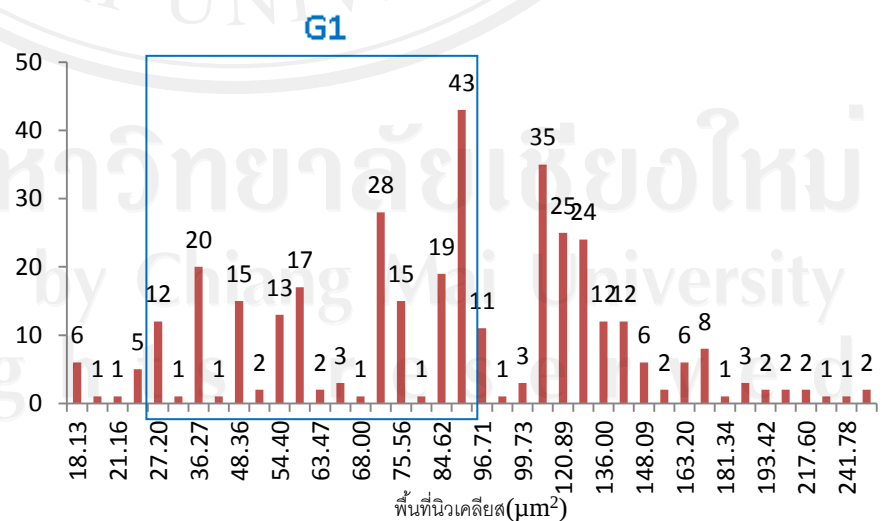
- ก. จากข้อ 3.2.2 (ข.3) จะได้ว่าเซลล์ในชั้น G1 มีช่วงขนาดนิวเคลียสอยู่ระหว่าง $24.18-90.62 \mu\text{m}^2$ ซึ่งในขณะนี้ถือว่าเป็นช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐานของเซลล์เชื้อสายนี้ในสภาวะปกติ ในระยะ G1



- ข. สมมุติว่าเซลล์เชื้อสายเดียวกันนี้เมื่อได้รับ cisplatin แล้วมีการกระจายของขนาดนิวเคลียสตามจำนวนเซลล์ดังกราฟข้างล่างนี้ (ซึ่งจะต่างจากกราฟในข้อ 3.2.2 (ข.3))



- ค. นำค่าช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐานของเซลล์นี้จากข้อ ก. คือ $24.18-90.62 \mu\text{m}^2$ มากำหนดลงในกราฟของเซลล์ที่ได้รับ cisplatin ข้างบนนี้ จะได้ช่วงของ G1 ของเซลล์หลังจากได้รับ cisplatin ดังแสดงในกราฟข้างล่างนี้



- ง. จะได้ว่าในช่วงขนาดของนิวเคลียสของเซลล์หลังจากได้รับ cisplatin ที่อยู่ในระยะ G1 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 45.64 ของเซลล์ทั้งหมด
- จ. ดังนั้นจะเห็นว่าเซลล์ที่ได้รับ cisplatin ซึ่งมีขึ้น G1 ร้อยละ 45.64 เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์เชื้อสายเดียวกันนี้ ก่อนได้รับ cisplatin ซึ่งมีร้อยละ 69.37 (จากอ้างอิง flow cytometry และจาก 3.2.2 (ข))

3.4 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์

เมื่อทำตามขั้นตอนที่ 3.2 การศึกษาวัฏจักรเซลล์ในสภาวะปกติและ 3.3 การศึกษาวัฏจักรเซลล์หลังจากได้รับ cisplatin จะได้กราฟการกระจายตัวของเซลล์ตามขนาดนิวเคลียสและเมื่อนำไปจัดให้อยู่ในวัฏจักรเซลล์ ทำให้ทราบจำนวนเซลล์ในระยะ G1, S และ G2 จากนั้นนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอน ดังนี้

3.4.1 นำข้อมูลจำนวนเซลล์ในระยะ G1, S และ G2 ทั้งที่เป็นเซลล์ในสภาวะปกติและเซลล์ที่ได้รับ cisplatin (วิเคราะห์แล้วในข้อ 3.2.2 และ 3.3.2) มาสร้างแผนภาพวงกลม เพื่อให้สามารถเห็นร้อยละของจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะได้ชัดเจนขึ้น โดยการทำแผนภาพวงกลมนี้ จะรวมร้อยละของการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะโพโทซิสด้วย เพื่อให้ครบร้อยละของวัฏจักรจำนวนเซลล์ทั้งหมด ดังตัวอย่างที่ยกมาตั้งแต่หัวข้อ 3.2.2 (ข)

เซลล์เกาะในสภาวะปกติเมื่อนับจำนวนจากกราฟ จะได้จำนวนเซลล์ทั้งหมด 421 เซลล์ คิดเป็นร้อยละ 100 ดังนั้นเมื่อคิดจำนวนเซลล์และร้อยละของแต่ละขั้นในวัฏจักรเซลล์ จะได้ผลดังตารางที่แสดง

ระยะในวัฏจักรเซลล์	จำนวน	คิดเป็นร้อยละ
G1	282	66.98
S	58	13.78
G2	70	16.63
M (ไมโทซิส)	11	2.61
A (apoptosis)	-	-

ตัวอย่างข้างต้นเป็นค่าของการทดลอง 1 ซ้ำทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ (ดูภาคผนวก ง) แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปสร้างกราฟวงกลมต่อไป ดังนั้นจะเห็นว่าค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ในแต่ละชั้นจะแตกต่างจากค่า flow cytometry (โดยเซลล์ HeLa และเซลล์ NCI-H1299 อ้างอิงค่า flow cytometry จาก จิรียา (2553) เซลล์ A549 อ้างอิงจาก สุพัตรา (2552)) เช่น G1 68.35 แต่จากการคำนวณในการทดลอง ได้ 66.98

3.4.2 นำข้อมูลร้อยละของเซลล์ในระยะต่างๆ มาเปรียบเทียบเทียบกับวิธี Paired t-test จากนั้นทำตารางแสดงความต่างทางสถิติ ระหว่างทั้งสองวิธี

3.4.3 นำข้อมูลเซลล์ที่มีการตายแบบอะโพโทซิสและการแบ่งตัวแบบไมโทซิสมาคำนวณเป็นร้อยละ จากนั้นทำตารางแสดงร้อยละการตายแบบอะโพโทซิส (apoptotic index)(ดูข้อ 3.5.6) และร้อยละการแบ่งตัวแบบไมโทซิส(mitotic index) (ดูข้อ 3.5.7)

3.5 วิธีการทางห้องปฏิบัติการทั่วไป

3.5.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์เชื้อสาย

เริ่มต้นจากการนำเซลล์ที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -196°C ออกมาละลายเพื่อเลี้ยงให้เพิ่มจำนวนในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 โดยแต่ละเซลล์เชื้อสายใช้อาหารสำเร็จรูป ดังนี้ HeLa ใช้อาหารชนิด DMEM, A-549 ใช้อาหารชนิด Ham-12 และ NCI-H1299 ใช้อาหารชนิด RPMI ซึ่งแต่ละชนิดผสมกับ 10% fetal bovine serum (FBS) จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) ที่อุณหภูมิ 37°C มีความเข้มข้นของ CO_2 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95% ซึ่งเป็นสภาวะมาตรฐานที่ใช้เลี้ยงเซลล์ตลอดการทดลองนี้ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง เมื่อเซลล์เจริญเติบโตประมาณ 80% ของพื้นภาชนะ หรือที่เรียกว่าสภาพ subconfluent จึงทำการเพาะเลี้ยงแยก (subculture)

3.5.2 การทำ trypsinization

3.5.2.1 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมที่อยู่ในภาชนะออกให้หมด จากนั้นล้างด้วย 1X phosphate buffer saline (PBS) 1 ml เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด

เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยสารที่ไปขัดขวางการทำงานของ 0.1% trypsin-EDTA

3.5.2.2 วางภาชนะที่มี PBS อยู่ภายในไว้ประมาณ 30 วินาที แล้วดูดทิ้งจนหมด

3.5.2.3 เติม 0.5 ml 0.1% trypsin-EDTA ปิดฝาแล้วเอียงให้ 0.1% trypsin-EDTA กลุมทั่วผิวด้านที่เซลล์เกาะอยู่ของ culture flask แล้วนำไปบ่มในตู้อบ 37 °C เป็นเวลา 2-5 นาที

3.5.2.4 ระหว่างช่วงเวลารอการบ่มตามข้อ (3.5.2.3) ให้นำมาส่องดูการหลุดของเซลล์จากพื้นภาชนะเลี้ยง ด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง เป็นระยะโดยเซลล์จะค่อยๆ ยกตัวและกลมขึ้นและหลุดจากพื้น เมื่อเซลล์หลุดออกเป็นส่วนใหญ่แล้ว ให้เคาะภาชนะเลี้ยงกับฝ่ามือเบาๆ (โดยไม่ให้ของเหลวภายในกระเด็นหรือสั่นไปที่ฝาของภาชนะเลี้ยง) เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ส่วนใหญ่หลุดจากพื้นผิวแล้ว

3.5.2.5 หยุดการทำงานของ 0.1% trypsin/EDTA solution โดยการเติมอาหาร DMEM ที่เสริมด้วย 0.1% trypsin-EDTA แล้วใช้ pasteur pipette ดูดเป่าเพื่อให้เซลล์กระจายออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวและสามารถนำไปใช้ต่อได้

3.5.3 การย้อมสี aceto – orcein

3.5.3.1 การย้อมสีในขณะที่เซลล์เกาะ

(ก) ล้างแผ่น cover slips ที่มีเซลล์เกาะอยู่ ด้วย 1X PBS

(ข) หยดสี aceto – orcein ลงไป พอท่วม cover slips พักไว้ 1 นาที

(ค) คว่ำแผ่น cover slip ลงบน slide ซับสีส่วนเกินออก

3.5.3.2 การย้อมสีหลังจากการทำ trypsinization

(ก) ทำการ trypsinization (ข้อ 3.5.2) ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 ml

(ข) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g เป็นเวลา 10 นาที

(ค) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้เหลือน้อยที่สุด จากนั้นใช้ micropipette ดูดเซลล์ปริมาณ 20 µl ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

(ง) เติมสี aceto – orcein ลงไป 1 หยด ดูดเป่าให้เข้ากัน

(จ) เซลล์ที่ผสมสีแล้ว มาหยดบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วย cover slips

3.5.4 การถ่ายภาพเซลล์

นำเซลล์ที่ต้องการถ่ายภาพย้อม มาทำการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ ที่กำลังขยาย 28.6 เท่า จำนวนหลายภาพ การถ่ายภาพนั้นควรปรับให้ภาพมีความคมชัดและต้องถ่ายด้วยความรวดเร็ว เนื่องจากหากเป็นสีย้อม aceto-orcein จะแห้งได้เร็ว เมื่อแผ่นสไลด์ที่มีเซลล์อยู่เกิดการแห้ง ทำให้ภาพที่ได้ไม่สวยงามและไม่คมชัด

3.5.5 การวัดขนาดนิวเคลียสและคำนวณพื้นที่นิวเคลียส

จากการทดลองที่ 3.2 และ 3.3 เมื่อทำการถ่ายภาพเซลล์เสร็จแล้ว นำเซลล์ไปติดเลขตั้งแต่ 1-400 ด้วยโปรแกรมตกแต่งภาพ จากนั้นทำการวัดขนาดนิวเคลียสโดยมีวิธีการ ดังนี้

3.5.5.1 วัดขนาดนิวเคลียสของเซลล์จากภาพถ่าย โดยใช้ไม้บรรทัดวัดในบริเวณกว้างที่สุดและยาวที่สุด เนื่องจากนิวเคลียสของเซลล์อาจมีหลายรูปร่าง เช่น ทรงกลม ทรงรี หรือรูปเม็ดถั่วซึ่งไม่สมมาตรกัน จากขั้นตอนนี้จะได้ความกว้างและความยาวนิวเคลียส ในหน่วยเซนติเมตร (cm)

3.5.5.2 วัดขนาดนิวเคลียสจากเซลล์ ที่ 1-400 ตามลำดับ จากนั้นกรอกข้อมูลความกว้างและความยาว ลงในตาราง

3.5.5.3 คำนวณพื้นที่ของนิวเคลียส โดยใช้สูตร

$$\text{พื้นที่ของนิวเคลียส (cm)} = \frac{\pi ab}{4}$$

โดย a คือ ความกว้างและ b คือความยาว

3.5.5.4 นำพื้นที่ในหน่วย cm มาเปลี่ยนให้อยู่ในหน่วย μm โดยนำมาคูณกับ 385 ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเทียบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ $1 \text{ cm} = 385 \mu\text{m}$ จากขั้นตอนนี้จะได้พื้นที่นิวเคลียสของทุกเซลล์ในหน่วย μm^2

3.5.5.5 กรอกข้อมูลที่ได้ลงในโปรแกรม Microsoft Excel

3.5.5.6 เซลล์ที่มีการตายแบบอะโพโทซิสและเซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส ให้แยกแล้วเก็บข้อมูลจำนวนเซลล์ไว้ เพื่อนำไปคำนวณร้อยละการตายแบบอะโพโทซิสตามและร้อยละการแบ่งตัวแบบไมโทซิสตามข้อ 3.5.8

3.5.6 ร้อยละการตายแบบอะโพโทซิส (apoptotic index)

ก. นับจำนวนเซลล์ที่มีการตายแบบอะโพโทซิส

ข. นำข้อมูลที่ได้มาเข้าสู่สูตร ดังนี้

$$\text{ร้อยละการตายแบบอะโพโทซิส} = \frac{\text{เซลล์ที่มีการตายแบบอะโพโทซิส}}{\text{เซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

3.5.7 การวัดการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitotic index)

ก. นับจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งตัว ในระยะ M phase ได้แก่ prophase metaphase anaphase และ telophase

ข. นำข้อมูลที่ได้มาเข้าสู่สูตร ดังนี้

$$\text{ดัชนีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (ร้อยละ)} = \frac{\text{เซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส}}{\text{เซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

ค. สร้างแผนภูมิเปรียบเทียบดัชนีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์ทั้งสามเชื้อสายเมื่ออยู่ในสภาวะปกติและสภาวะที่ได้รับสารนาน 72 ชั่วโมง

3.6 การจัดทำสื่อการสอน

จัดทำเอกสารประกอบการสอนและโปสเตอร์เพื่อเผยแพร่ความรู้และสามารถนำไปใช้ประกอบในการเรียนการสอนในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย

3.6.1 นำภาพถ่ายเซลล์ในระยะ G1, S และ G2 รวมทั้งระยะ M phase มาใช้ประกอบในเอกสารประกอบการสอนระดับมัธยมศึกษาปีที่ 4 หน่วยที่ 2 เรื่อง หน่วยของสิ่งมีชีวิต มาตรฐานการเรียนรู้ ว 1.1 : เข้าใจหน่วยพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ของโครงสร้างและหน้าที่ของระบบต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตที่ทำงานสัมพันธ์กัน มีกระบวนการสืบเสาะหาความรู้ สื่อสารสิ่งที่เรียนรู้และนำความรู้ไปใช้ในการดำรงชีวิตของตนเองและดูแลสิ่งมีชีวิต

3.6.2 จัดทำโปสเตอร์เพื่อเผยแพร่ความรู้ โดยจัดแสดงเซลล์มะเร็งในสถานะเกาะ, สถานะเกาะย้อมสี aceto-orcein, เซลล์สถานะลอย และเซลล์สถานะลอยที่ย้อมสี

aceto-orcein และแสดงเป็นวัฏจักรของเซลล์ในระยะต่างๆ ได้แก่ G1, S, G2 และ
ระยะ M phase ซึ่งเป็นการนำภาพถ่ายเซลล์สถานะต่างๆ รวมถึงระยะต่างๆ ของวัฏ
จักรเซลล์จากการทดลองมาประกอบ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved