

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

การวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือการทดสอบสารเคมีกำจัดแมลง ในการทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ลิมโฟไซต์ของคน และการทดสอบการขาดของดีเอ็นเอโดยวิธี single cell gel electrophoresis หรือ comet assay

หลักการของการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม ใช้หลักการที่เนื่องมาจากมีสารจากธรรมชาติ ยา หรือ สารเคมีบางอย่างที่มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ จึงนำหลักการนี้มาใช้ในการทดสอบสารเคมี ที่สงสัยว่าจะเป็นพิษหรือมีผลต่อสารพันธุกรรม โดยเติมสารที่สงสัยลงในหลอดเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่นิยมใช้เพื่อทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro) เป็นเซลล์ที่ไม่สามารถแบ่งตัวได้เอง จึงจำเป็นต้องใช้ mitogen เช่น phytohaemagglutinin (PHA) กระตุ้นการแบ่งตัว หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) เพื่อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยจะเลี้ยงไว้ในตู้บ่ม หลังจากเติมสารกระตุ้นการแบ่งตัว 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไป เลี้ยงต่ออีกจนครบ 72 ชั่วโมง แล้วทำการเตรียมโครโมโซม นำไปย้อมสี และตรวจวิเคราะห์เชิงโครงสร้างของโครโมโซม

การทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการวิจัย

เป็นอาสาสมัครหญิง อายุ 20-30 ปี จำนวน 5 ราย สุขภาพสมบูรณ์ไม่เป็นโรคเรื้อรัง ไม่ได้รับยารักษาโรคเป็นประจำ ไม่เคยได้รับ deep X-ray ไม่เป็นโรคที่มีความผิดปกติของโครโมโซม

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเตรียมโครโมโซม

- 1.1 หลอดแก้วสำหรับปั่น (centrifuge tube) ขนาด 110 x 16 มิลลิเมตร
- 1.2 กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 22
- 1.3 กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 22
- 1.4 Automatic pipette ขนาด 1-10 ไมโครลิตร
- 1.5 Automatic pipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร

- 1.6 Automatic pipette ขนาด 1-10 มิลลิลิตร
 - 1.7 สไลด์แก้ว ขนาด 1x3 นิ้ว
 - 1.8 couplin jar
 - 1.9 Lamainar flow (NUAIRE : U.S.A)
 - 1.10 เครื่องผสม (Vortex mixer, GENIE:U.S.A)
 - 1.11 เครื่องปั่น (centrifuge,ECCO : Germany)
 - 1.12 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope, Olympus : Japan)
 - 1.13 กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast (Olympus : Japan)
 - 1.14 ตู้อบ (Incubator,NUAIRE : U.S.A.)
2. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเตรียมโครโมโซม
 - 2.1 RPMI 1640 (Seromed:Germany)
 - 2.2 Fetal bovine serum (Hyclone)
 - 2.3 Phytohaemagglutinin (PHA - L,Biochrom KG)
 - 2.4 Colcemid ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (GIBCO BRL)
 - 2.5 Mitomycin C (Sigma)
 - 2.6 Sodium chloride (NaCl)
 - 2.7 Potassium chloride (KCl)
 - 2.8 Di-sodium hydrogenphosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - 2.9 Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)
 - 2.10 Gracial acetic acid (Merck)
 - 2.11 95% ethanol
 - 2.12 Giemsa stain (Merck)
 - 2.13 Lannate-L ความเข้มข้น 18 % W/V
 - 2.14 Tamaron 600 SL ความเข้มข้น 60 % W/V
 - 2.15 Furadan 3% G

การเพาะเลี้ยงเซลล์

1.วิธีการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์

น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์จะเตรียมโดยเทคนิคปราศจากเชื้อ(aseptic technique) ซึ่งน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยสารละลาย RPMI 1640 ผสมยาปฏิชีวนะคือ streptomycin และ ampicillin และ fetal bovine serum 20 % ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

RPMI 1640 เตรียมโดยละลายผงสำเร็จรูป RPMI 1640 น้ำหนัก 10.4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร sodium bicarbonate 1.2 กรัม เติม ampicillin 0.03 กรัมต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อผสมกันดีแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร กรองน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ด้วย sterilized filter ขนาด 0.22 ไมครอน แยกบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อขวดละ 80 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

Fetal bovine serum แยกบรรจุขวดขนาด 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนเพาะเลี้ยงเซลล์ นำ fetal bovine serum จำนวน 20 มิลลิลิตร มาผสมกับ RPMI 1640 จำนวน 80 มิลลิลิตร

Phytohaemagglutinin หรือ PHA-L เตรียมโดยละลายผง PHA-L 1 ขวดขนาด 5 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

2.วิธีการเตรียมสารละลาย

Mitomycin C เตรียมโดยละลายผง mitomycin C 1 ขวด ขนาดบรรจุ 10 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เพื่อเป็น stock solution ด้วยน้ำกลั่น โดยเจือจาง mitomycin C ให้ได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งขณะเพาะเลี้ยงเซลล์จะเติมสารละลาย mitomycin C เพื่อเป็น positive control จำนวน 6.25 ไมโครลิตรต่อ 5 มิลลิลิตรน้ำยาเลี้ยงเซลล์ เพื่อที่จะได้สารละลาย mitomycin C ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แลนเนท-แอล (Lannate-L) แลนเนทที่นำมาใช้ทดสอบมีความเข้มข้น 180 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ทดสอบ

ทามารอน 600 เอสแอล (Tamaron 600 SL) ทามารอนที่นำมาใช้ทดสอบมีความเข้มข้น 60 กรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ฟูราดาน 3% จี (Furadan 3% G) ละลายฟูราดานจำนวน 0.5 กรัม ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มิลลิลิตร จะได้ฟูราดานความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

เจาะเลือด (peripheral blood) จากอาสาสมัครหญิง คนละ 7-8 มิลลิลิตร โดยใช้ steried disposable syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่เคลือบด้วยสาร heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด เติมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเลี้ยงเซลล์ แต่ละหลอดทั้ง 13 หลอด เติม phytohaemagglutinin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรน้ำยาเลี้ยงเซลล์ เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ลิ้มฟิซัยท์แบ่งตัว หลังจากนั้นเติมเลือดจำนวน 0.3 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดแก้วให้แน่นเขย่าให้เข้ากัน นำไปเก็บที่ตู้อบอุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำหลอดเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้อบมาเติมน้ำสารดังนี้

- หลอดที่ 1 เป็น negative control โดยเติมน้ำกลั่น จำนวน 50 ไมโครลิตร
- หลอดที่ 2 เป็น solvent control โดยเติม dimethylsulfoxide(DMSO) จำนวน 50 ไมโครลิตร
- หลอดที่ 3 เป็น positive control โดยเติม mitomycin C ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 4 เติมน้ำสารแลนเนท ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 5 เติมน้ำสารแลนเนท ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 6 เติมน้ำสารแลนเนท ความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 7 เติมน้ำสารแลนเนท ความเข้มข้น 1,600 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 8 เติมน้ำสารทามารอน ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 9 เติมน้ำสารทามารอน ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 10 เติมน้ำสารทามารอน ความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 11 เติมน้ำสารฟูราดาน ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 12 เติมน้ำสารฟูราดาน ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์
- หลอดที่ 13 เติมน้ำสารฟูราดาน ความเข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลังจากเติมน้ำสารแล้วปิดฝาให้แน่นเขย่าให้เข้ากัน นำไปใส่ตู้อบจนครบชั่วโมงที่ 72 แล้วจึงนำหลอดเลี้ยงเซลล์ออกมาเติม colcemid 0.2 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อหยุดการแบ่งเซลล์และทำลาย spindle fibers ปิดฝาให้แน่นเขย่าให้เข้ากัน นำไปใส่ตู้อบต่ออีก 30 นาที จึงนำหลอดเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวออกมาเพื่อเตรียมโครโมโซม

การเตรียมโครโมโซม

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเตรียมโครโมโซม

Phosphate buffer solution (PBS) เตรียมโดยละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.15	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม

Hypotonic solution (0.075 M KCl) เตรียมโดยละลายผง KCl 5.62 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

Carnoy fixative เตรียมโดยผสม 95% ethanol กับ acetic acid อัตราส่วน 3:1 เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C

2. วิธีการเตรียมสไลด์โครโมโซม

เมื่อครบ 72 ชั่วโมงหลังจากเติม colcemid นำหลอดเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้อบ เหย้าให้เข้ากันดี แล้วเทใส่ในหลอดทดลองสำหรับปั่นซึ่งเขียนหมายเลขตรงกับหลอดเลี้ยงเซลล์เอาไว้แล้ว จากนั้นนำไปทำขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 ปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไปให้เหลือสารละลายและเซลล์กันหลอดประมาณ 1.5 มิลลิลิตร (ขั้นตอนต่อไปในการปั่นแยก จะใช้ความเร็วและเวลาเหมือนขั้นตอนที่ 2.1)

2.2 ผสมสารละลายและเซลล์ส่วนที่เหลือด้วยเครื่องผสม (Vortex mixer) ขณะผสมเติม phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปปั่น จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร

2.3 ผสมให้เข้ากันดี ในขณะเดียวกันก็เติม hypotonic solution (0.075 M KCl) จำนวน 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้งเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ผ่านมา

2.4 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2.3 อีก 1 ครั้ง

2.5 ผสมเซลล์กับสารที่เหลือ ขณะเดียวกันก็เติม Carnoy fixative ที่เย็น จำนวน 5 มิลลิลิตร การเติม Carnoy fixative ในครั้งแรกนี้ ควรหยดซ้ำๆ ที่ละหยดใน ขณะที่กำลังผสมเซลล์บน Vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นและดูดส่วนบนทิ้งเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2.1 หลังจากเติม

Carnoy fixative เรียบร้อยแล้วควรนำขวดน้ำยา Carnoy fixative นี้ ไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°C และเมื่อต้องการจะให้จึงค่อยนำออกมาใช้เป็นครั้งๆไป

2.6 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2.5 อีก 2 ครั้ง ซึ่งการผสม Carnoy fixative อีก 2 ครั้ง ที่เหลือนี้สามารถเติมลงไปได้ตามปกติเช่นเดียวกับการเติม PBS และ KCl ในขั้นตอนที่ผ่านมา

2.7 เมื่อเติม Carnoy fixative ครบ 3 ครั้ง และนำไปปั่นแยกแล้ว ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง โดยขั้นตอนนี้จะดูดสารละลาย ส่วนบนทิ้งให้มากจนเหลือติดกันหลอดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร และต้องระวังไม่ให้เซลล์ที่อยู่กันหลอดถูกดูดออกไปด้วย

2.8 เติม Carnoy fixative ที่เย็นลงไปอีกประมาณ 0.5-1.0 มิลลิลิตร (ขึ้นกับปริมาณเซลล์ที่ติดกันหลอด) จากนั้นใช้ Pasteur pipette ทำให้เซลล์หลุดออกจากกันหลอดขึ้นมา แล้วผสมให้เข้ากันดีกับ Carnoy fixative

2.9 หยดเซลล์ซึ่งผสมอยู่กับ Carnoy fixative ลงบนสไลด์ที่สะอาดแผ่นละ 1 หยด วางสไลด์ให้เกือบแห้ง แล้วนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 60°C จนแผ่นสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นสไลด์ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพของโครโมโซมและเมตาเฟสด้วยกล้อง phase contrast เลือกลสไลด์ที่มีคุณภาพดีไว้หลอดละประมาณ 7-8 แผ่น ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าจะเพียงพอในการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม เซลล์ที่เหลือในแต่ละหลอดเก็บใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ถ้าต้องการเตรียมโครโมโซมเพิ่มอีกก็นำเซลล์ที่เก็บไว้นี้มาเตรียมใหม่ได้

3. การตรวจสอบคุณภาพสไลด์

การตรวจสอบคุณภาพของสไลด์ เพื่อต้องการทราบว่าจะมีจำนวนเมตาเฟสที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมที่ดีเป็นจำนวนมากพอที่จะนำมาวิเคราะห์หรือไม่ โดยถ้ามีจำนวนเมตาเฟสเป็นจำนวนพอเหมาะหรือมีเป็นจำนวนมากพอแล้ว แต่มีการกระจายตัวของโครโมโซมมากหรือน้อยเกินไปก็ควรแก้ไขด้วยเทคนิคหรือวิธีต่างๆดังนี้

กรณีที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมมากเกินไป อาจแก้ไขโดยการนำแผ่นสไลด์เข้าตู้อบให้เร็วขึ้นกว่าปกติ หรือโดยการหยดเซลล์ให้ชิดแผ่นสไลด์มากขึ้น

กรณีที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมน้อยเกินไป อาจแก้ไขโดยนำแผ่นสไลด์เข้าตู้อบให้ช้ากว่าปกติเล็กน้อย หรืออาจเติม Carnoy fixative ตามลงไปอีก 1-2 หยด รอจนสไลด์เกือบแห้งแล้วนำเข้าตู้อบ หรืออาจใช้วิธีหยดเซลล์ให้ห่างจากสไลด์มากกว่าปกติ ซึ่งจะช่วยให้มีการกระจายตัวของโครโมโซมได้ดีขึ้น อีกวิธีหนึ่งซึ่งอาจช่วยแก้ไขได้คือ นำเซลล์ไปแช่เย็น แล้วนำมาหยดบนสไลด์

4. วิธีการเตรียมสารละลายและสีย้อมโครโมโซม

สารละลาย Sorensen's buffer pH 7.0 โดยใช้สารละลาย $1/15\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ ผสมกับ $1/15\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ อย่างละ 12.5 มิลลิลิตร

$1/15\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ เตรียมโดยละลาย KH_2PO_4 4.535 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

$1/15\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ เตรียมโดยละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

Giemsa 10% เตรียมโดยใช้สี Giemsa stock solution 5 มิลลิลิตรผสมกับ Sorensen's buffer pH 7 จำนวน 45 มิลลิลิตร ใน couplin jar

5. วิธีการย้อมเพื่อศึกษาความผิดปกติของโครโมโซม

แช่สไลด์ใน Giemsa 10% นาน 3 นาที จากนั้นนำสไลด์มาล้างออกด้วยน้ำประปา นำแผ่นสไลด์ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

6. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซม

การตรวจวิเคราะห์จะใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,500 เท่า โดยจะเลือกดูเมตาเฟสที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมดี ไม่ติดสีจางหรือเข้มเกินไป และเลือกเมตาเฟสที่มี 46 โครโมโซม โดยแต่ละหลอดทดลองจะนับตรวจวิเคราะห์จำนวน 100 เมตาเฟส ดังนั้นจำนวนโครโมโซมที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดต่อตัวอย่างเลือดของแต่ละชุดการทดลองจะมี 23,000 โครโมโซม ทำการวิเคราะห์ผลและบันทึกผลความผิดปกติของโครโมโซมที่ตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบฟอร์ม และในการทดลองแต่ละชุดจะนับค่า mitotic index ด้วย โดยนำสไลด์ที่เตรียมได้มานับจำนวน mitosis คือ การนับจำนวนลิโฟไซท์บนสไลด์พร้อมทั้งนับจำนวน mitosis ที่พบ โดยนับจำนวนลิโฟไซท์ 1,000 เซลล์ แล้วบันทึกจำนวน mitosis ที่พบไว้ แล้วคำนวณหา mitotic index โดยใช้สูตร (อำนาจ มีเวที, 2534)

$$\text{M.I.} = \frac{\text{No. of cells in division}}{\text{Total No. of cells}} \times 100$$

การทดสอบโคเมทแอสเสย์ (comet assay หรือ single cell gel electrophoresis assay)

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการวิจัย

เป็นอาสาสมัครหญิงคนเดียวกับการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม เจาะเลือดจำนวน 10 มิลลิลิตร ทำภายหลังจากการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม ขั้นตอนการทำให้ดังต่อไปนี้

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ comet assay
 - 1.1 สไลด์แก้ว ที่มีฝ้าที่ปลายด้านหนึ่ง (microscope slides, frosted)
 - 1.2 Pasteur pipette และ จุกยาง
 - 1.3 Cover slip ขนาด 22 x 26 มิลลิเมตร
 - 1.4 Micropipette ขนาด 1-10 ไมโครลิตร
 - 1.5 Micropipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
 - 1.6 Autopipette ขนาด 1-10 มิลลิลิตร
 - 1.7 Pipette tips
 - 1.8 Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
 - 1.9 Electrophoresis unit ได้แก่ power supply และ chamber (BIORAD)
 - 1.10 Microcentrifuge (IWAKI)
 - 1.11 Fluorescence microscope (ZEISS)
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ comet assay
 - 2.1 Agarose (normal melting point, NMP, Sigma)
 - 2.2 Agarose (low melting point, LMP, Sigma)
 - 2.3 Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)
 - 2.4 Ethelenediamine tetraacetic acid (EDTA) disodium salt (Sigma)
 - 2.5 Ethidium bromide
 - 2.6 Concentrated hydrochloric acid (HCl)
 - 2.7 Sodium chloride (NaCl)
 - 2.8 Sodium lauroyl sarcosinate
 - 2.9 Sodium hydroxide (NaOH)

2.10 Phosphate Buffer Saline (PBS) Ca^{++} , Mg^{++} free

2.11 Tris (Tris [hydroxymethyl]aminomethane)

2.12 Triton X-100 (Sigma)

2.13 RPMI 1640 (Seromed)

2.14 Histopaque (Sigma)

2.14 Lannate-L ความเข้มข้น 18 % W/V

2.15 Tamaron 600 SL ความเข้มข้น 60 %W/V

2.16 Furadan 3% G

1. เตรียมสารเคมีในการทำ comet assay

1.1 Lysing solution

เตรียมโดยละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

2.5 M NaCl	146.1	กรัม
100 mM EDTA	37.2	กรัม
10 mM Tris	1.2	กรัม ปรับ pH 10 ด้วย NaOH 8 กรัม
1% Na lauroyl sarcosinate	10.0	กรัม

ผสมกับน้ำ 890 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ก่อนใช้ต้องเติม Triton X-100 จำนวน 1 มิลลิลิตร และ dimethyl sulfoxide (DMSO) จำนวน 89 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 60 นาที

1.2 Electrophoresis buffer (300 mM NaOH / 1 mM EDTA)

ละลาย NaOH 7.2 กรัม ในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร เติม 200 mM EDTA 3.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เตรียมก่อนใช้ 45-60 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.3 Neutralization buffer

ละลาย Tris aminomethane (Tris buffer) 24.2 กรัม ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 450 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.5 ด้วย HCl เติมน้ำจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.4 Staining solution (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ละลาย ethidium bromide 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เป็น stock solution เก็บไว้ในขวดสีชา ก่อนใช้น้ำ stock solution มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:10

2. การแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ (Ribas และคณะ, 1995; Andreoli และคณะ, 1997; Mostafa และคณะ, 1998; Noroozi และคณะ, 1998)

2.1 นำเลือด 10 มิลลิลิตร มาใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 2 หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร เติม sterilized phosphate buffer solution (PBS) หลอดละ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2 ใส่ sterilized histopaque จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ปราศจากเชื้อ 4 หลอด

2.3 นำเลือดที่ผสมกับ PBS ในข้อ 2.1 over layer ลงบน histopaque อย่างช้าๆ หลอดละ 5 มิลลิลิตร รอให้เลือดลงไป ผสมกับ histopaque แล้วนำไปปั่น ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

2.4 หลังจากการปั่นจะเห็นว่ามีการแยกส่วนของเม็ดเลือด โดยเม็ดเลือดแดงและgranulocyte จะตกอยู่ก้นหลอด และจะเห็นวงแหวนขาวขุ่นอยู่ตรงกลางระหว่างพลาสมาที่กับ histopaque (ซึ่งเป็นส่วนของ mononuclear cells) แสดงดังรูปที่ 8 ใช้ Pasteur pipette ที่ปราศจากเชื้อดูดส่วนขาวขุ่นซึ่งเป็นส่วนที่มีเซลล์ลิมโฟไซต์มาใส่หลอดหนึ่ง



รูปที่ 8 แสดงหลอดทดลองที่ทำการปั่นแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ จะเห็นวงแหวนสีขาวขุ่นที่อยู่ระหว่างพลาสมาที่กับ histopaque เป็นบริเวณที่มีเซลล์ลิมโฟไซต์

2.5 ทำการปั่นล้างลิโฟไซท์ด้วย steriled PBS จำนวน 3 ครั้ง

2.6 ในการปั่นครั้งสุดท้ายดูด PBS ออกให้หมด เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ลงไป 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ cell suspension ความเข้มข้นประมาณ 40,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

2.7 เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารดังต่อไปนี้

หลอดที่ 1 เป็น negative control โดยเติมน้ำกลั่น จำนวน 30 ไมโครลิตร

หลอดที่ 2 เป็น solvent control โดยเติม dimethylsulfoxide (DMSO) จำนวน 30 ไมโครลิตร

หลอดที่ 3 เป็น positive control โดยเติม mitomycin C ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 4 เติมสารแลนเนท ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 5 เติมสารแลนเนท ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 6 เติมสารแลนเนท ความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 7 เติมสารแลนเนท ความเข้มข้น 1,600 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 8 เติมสารทามารอน ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 9 เติมสารทามารอน ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 10 เติมสารทามารอน ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 11 เติมสารฟูราดาน ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 12 เติมสารฟูราดาน ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

หลอดที่ 13 เติมสารฟูราดาน ความเข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$ น้ำยาเลี้ยงเซลล์

2.8 เติม cell suspension ในข้อ 2.6 ลงในหลอดที่เติมสารแล้ว หลอดละ 30 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำหลอดไปใส่ตู้บ่ม 37 °C นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครึ่งสุดท้ายดูด PBS ออกจนเกือบหมด แล้วเติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 หลอดละ 30 ไมโครลิตร เพื่อทำ comet assay ต่อไป

3. การเตรียมสไลด์

3.1 ละลาย 0.75 % low melting agarose (LMA) และ 1.0 % normal melting agarose (NMA) โดยให้ความร้อน

3.2 นำ 0.75% low melting agarose ที่ละลายแล้วมาไว้ที่ 37 °C เพื่อรอนำมาผสมกับ cell suspension

3.3 ทำเจลชั้นที่ 1 โดยดูด 1% normal melting agarose จำนวน 90 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์บริเวณที่เป็นผ้า ปิดด้วย cover slip ขนาด 22x26 มิลลิเมตร พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ นำไปใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วแกะ cover slip ออกโดยใช้ใบมีด

3.4 ทำเจลชั้นที่ 2 โดยผสม 0.75% low melting agarose จำนวน 90 ไมโครลิตร กับ cell suspension จำนวน 10 ไมโครลิตร หยดลงเจลชั้นที่ 1 แล้วปิดทับด้วย cover slip ขนาด 22x26 มิลลิเมตร แล้วนำไปใส่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาแกะ cover slip ออก

3.5 นำสไลด์ไปใส่ใน lysing solution ที่ 4°C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ cell membrane แตกออกเมื่อครบเวลาเอาสไลด์ออกจาก lysing solution มาใส่ใน electrophoresis buffer ซึ่งอยู่ใน jar ที่ 4°C นาน 20 นาที เพื่อที่จะให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออก

4. Electrophoresis และการย้อมสี (staining)

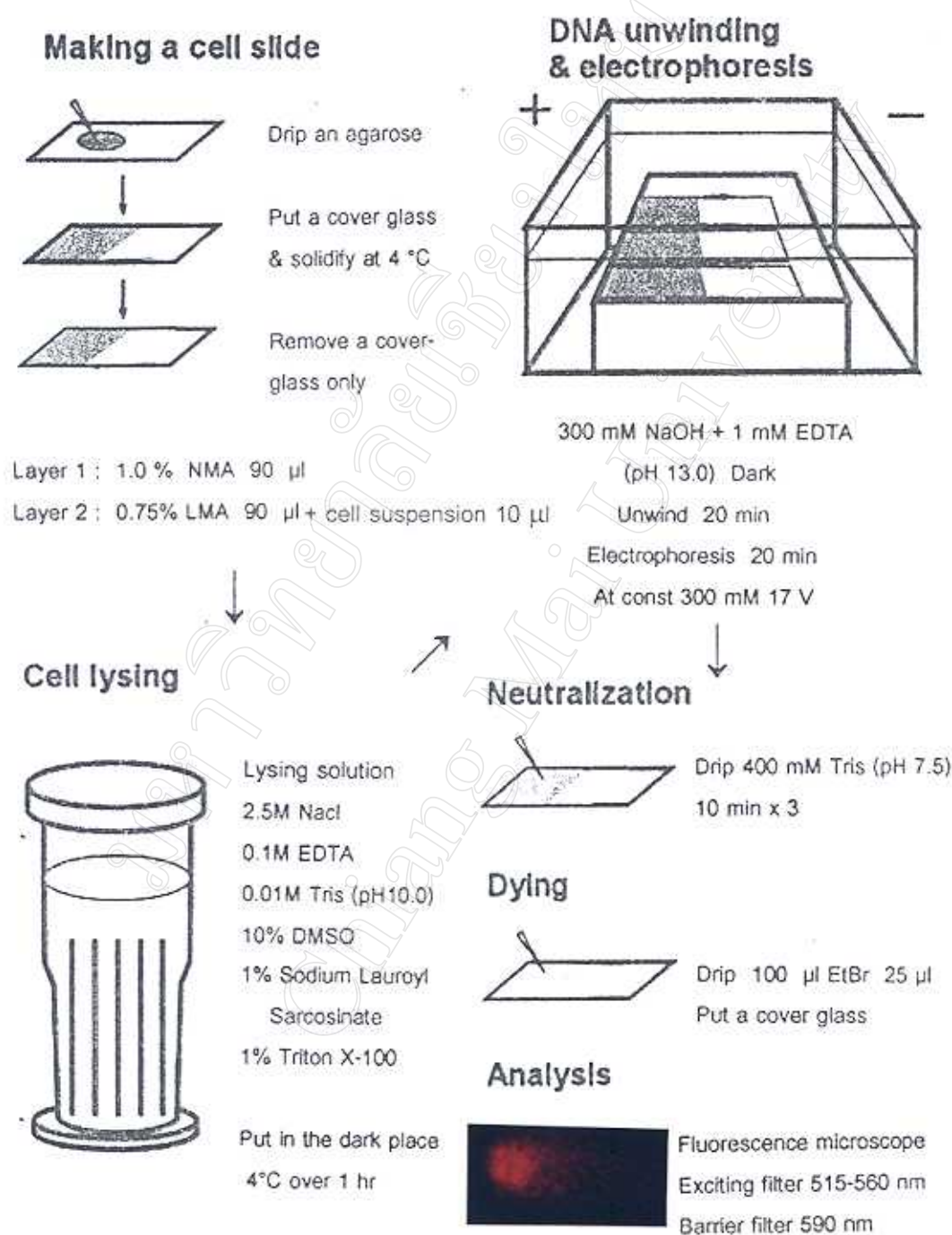
4.1 เมื่อครบเวลา DNA unwind นำสไลด์มาทำการ run electrophoresis ใน electrophoresis chamber ที่มี alkaline buffer pH 13.0 โดยบัฟเฟอร์จะต้องท่วมสไลด์ ใช้กระแสไฟฟ้า 17 โวลท์ 300 มิลลิแอมป์ นาน 20 นาที

4.2 หลังจากนั้นนำสไลด์มาล้างด้วย neutralization buffer นาน 5 นาที 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเทบัฟเฟอร์ออกให้หมด ซับขอบสไลด์ด้วยกระดาษทิชชู

4.3 ย้อมเจลโดยการหยด ethidium bromide ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ลงบนเจล แล้วปิดทับด้วย cover slip ขนาด 22x26 มิลลิเมตร

4.4 นำไปดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ กรณีที่ยังไม่ได้ตรวจวิเคราะห์ในทันที ให้เก็บสไลด์ไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 4°C

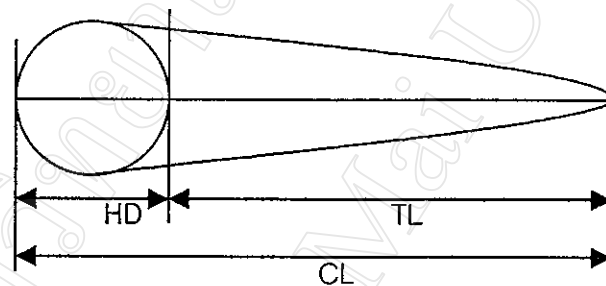
ทุกความเข้มข้นของ cell suspension ทำเช่นเดียวกันในขั้นตอนการเตรียมสไลด์ การ run electrophoresis และการย้อมสี และในแต่ละหลอดทดลองจะทำ comet assay ซ้ำอีก 1 ครั้ง



แผนภาพที่ 9 แสดงขั้นตอนในการทำ single cell gel electrophoresis หรือ comet assay

5. การตรวจวิเคราะห์

ใช้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ excitation filter 515-560 นาโนเมตร barrier filter 590 นาโนเมตร กำลังขยาย 160x ตรวจหาบริเวณที่เซลล์ที่มีการกระจายตัวพอดี หลังจากนั้นจึงดูด้วยกำลังขยาย 1000x ใช้กล้องวิดีโอจับภาพถ่ายทอดไปยังจอรับภาพ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Monteith และ Vanstone ปี 1995 แล้วทำการวัดขนาดของโคเมทโดยวิธีของ McCarthy และคณะ (1997) โดยวัดความยาวของเซลล์ตั้งแต่หัวจรดหาง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัวของเซลล์ นำไปลบกันเพื่อหาความยาวของส่วนหางของเซลล์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียส ทำการวัดทั้งหมด 100 เซลล์ จากแต่ละหลอดทดลอง รวม 1,300 เซลล์ต่อราย ค่าที่วัดได้เป็นไมโครเมตร



รูปที่ 10 แสดงการวัดความยาวของเซลล์โคเมท

HD(head diameter) คือ เส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ หรือความยาวส่วนหัวของเซลล์

CL(comet length) คือ ความยาวตั้งแต่หัวจรดหาง หรือความยาวทั้งหมดของเซลล์

TL(Tail length) คือ ความยาวของส่วนหางของเซลล์

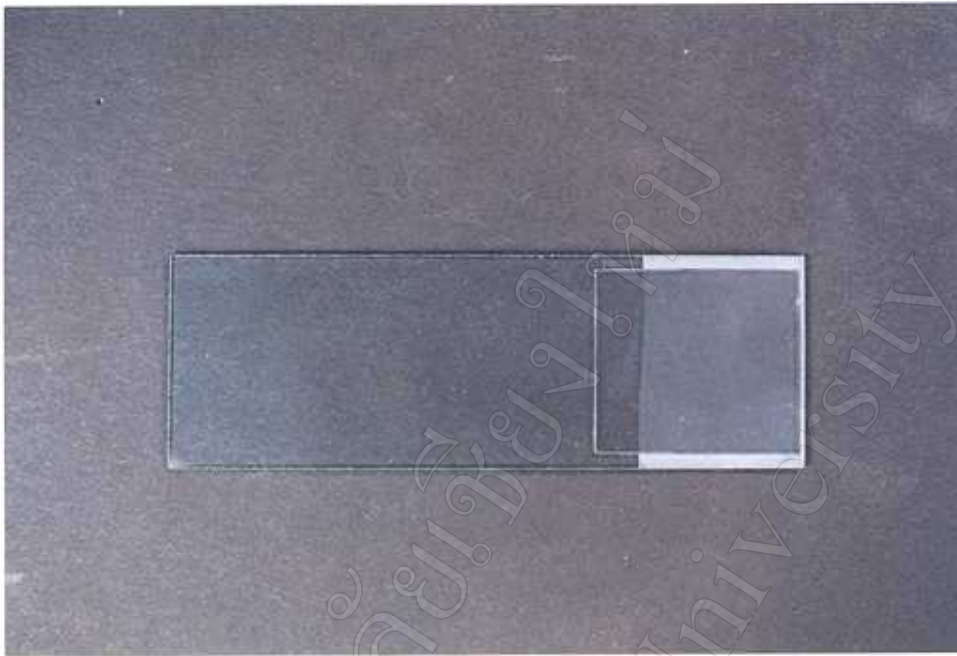
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ (สุมาลี สิงหนิยม, 2542)

1. ผลการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม ทดสอบรายกลุ่มคือ กลุ่มที่เติมแลนเนท-แอล กลุ่มที่เติมทามารอน กลุ่มที่เติมฟูราดาน 3% จึ ด้วยวิธี one-way Analysis of Variance (one-way ANOVA) และทดสอบรายคู่ด้วยวิธี Scheffe' test ในกรณีที่ข้อมูลมีความแปรปรวนเท่ากัน และใช้ Dunnett test ในกรณีที่ข้อมูลมีความแปรปรวนไม่เท่ากัน

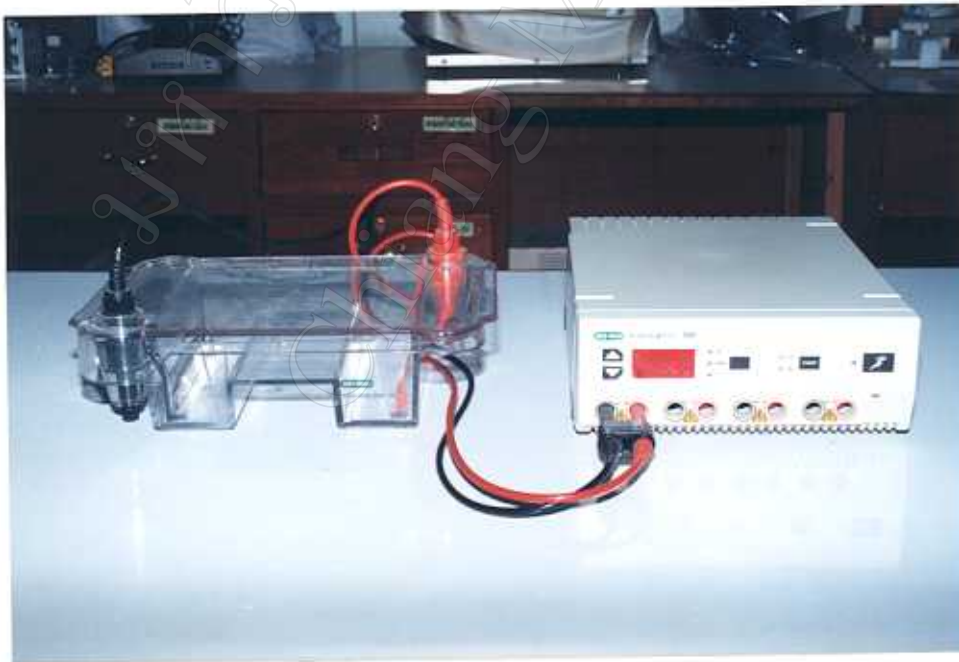
2. ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี comet assay ทดสอบรายกลุ่มด้วยวิธี Kruskal-Wallis analysis of Variance และทดสอบเปรียบเทียบรายคู่ด้วยวิธี Mann-Whitney test

3. เปรียบเทียบผลการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซมและ comet assay ระหว่าง negative control (หลอดที่เติมน้ำกลั่น) กับ positive control (หลอดที่เติม mitomycin C ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใช้วิธี t-test

ทุกการทดสอบใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window



รูปที่ 11 แสดงสไลด์ฝ้า (frosted slide) ที่ทำ microgel



รูปที่ 12 แสดง electrophoresis set ได้แก่ power supply และ electrophoresis chamber



รูปที่ 13 แสดงกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ วิธี comet assay



รูปที่ 14 แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดเซลล์ที่ได้จากการทำ comet assay ได้แก่ กล้องฟลูออเรสเซนซ์ กล้องวิดีโอจับภาพ จอภาพ เครื่องคอมพิวเตอร์