บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

สารเคมี

Mitogens:

LPS: Lipopolysaccharide WS. Typhosa (Difco Laboratory)

PWM: Pokeweed (Phytolacca Americana) (Sigma)

Con A: Concanavalin A (Pharmacia)

MTT: [3(4,5-dimethylthiazol 2 –yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Gibco BRL)

FCS: Fetal calf serum (Gibco BRL)

Glutamine (Sigma)

Hepes buffer---(Gibco BRL)

Mercaptoethanol (Sigmal)

Mitomycin C (Sigma)

Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL)

Tris base (Sigma)

Ethanol (Sigma)

DMSO: dimethyl sulfoxide (Sigma)

HCl (Sigma)

น้ำ

น้ำที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเป็น ultra pure water ที่ได้จากการผ่าน ionizied-double distilled water ในเครื่องกรองน้ำ nanopure (Barnsted)

วัสดุ

วัสดุปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

60 x15 mm petri plates (Falcon)

15 ml และ 50 ml conical tubes (Sarstedt)

5 ml snap cap culture tubes (Falcon)

Pasteur piptettes

Glass pipettes (1, 5, 10, 25 ml)

Culture flasks ขนาด 25 และ 75 cm^2 (Nunc)

96 well flat bottom plate (Nunc)

Sterile filter unit ขนาด 1000 ml (0.2 μm, Gelman)

Acrodisc 2.5 ml (0.2 μm; Gelman)

วัสดุอื่น ๆ

12 x75 mm glass test tubes

Slide (25.4x72 mm) และ cover slip (22x22 mm, หนา 0.1-0.7 mm)

Single frosted end slide (25.4x72 mm)

อาหารหนูเม้าส์ (เบอร์ 082, ซีพี)

ถุงมือ

ผ้าปิดจมูก เสื้อและหมวกเพื่อใช้ในอาคารสัตว์ทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

หม้อนึ่งความดันไอ

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ

Compound microscope

Inverted microscope

Laminar flow hood class II

ตู้เย็น

ตู้แช่แข็ง (-20°C)

ELISA plate reader

Stirrer และ hot plate

Haemocytometer

8-Multichannel pipette ขนาด 1-20 และ 50-200 ไมโครลิตร

Micropipette ขนาด 1-20, 1-200 และ 1-1000 ไมโครลิตร

Liquid nitrogen tank

Carbon dioxide incubator

อุปกรณ์ผ่าตัดขนาดเล็ก

กรงเลี้ยงหนูแบบมีฝาซึ่งบุ Hepa filter เพื่อให้ปลอดเชื้อ

วิธีดำเนินการวิจัย

ทุกการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) กระทำในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood class II) ใช้วัสดุและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ปลอดเชื้อ และใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ผลการทดลองที่แสดงทุกการทดลองเป็นตัวแทนของการทดลองแบบเดียวกันซ้ำอย่างน้อย 2-3 ครั้ง

1. การพัฒนาวิธีการทดสอบ mitogenesis

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูเม้าส์ (C57Bl/6J) เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถูกเลี้ยงที่อาคารสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นระยะเวลา 1-2 สัปดาห์เป็นอย่างต่ำ เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ (acclimatization) ก่อนนำมาใช้ในงานทดลอง หนู C57Bl/6 ถูกเลี้ยงในกรงพลาสติคขนาด 7.5 X 11.5 X 5 นิ้ว ที่ปูด้วยขี้กบ (ห้างหุ้นส่วนจำกัดอี๊ดไม้พาเหรด) ปลอดเชื้อ (อุณหภูมิ 121°C 20 นาที) และใช้ที่ปิดด้วยฝาซึ่งมีกระดาษกรองชนิด hepa filter (filter cap จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยมีหนู 4 ตัวต่อ 1 กรง หนูได้รับน้ำและอาหารสำหรับหนูเม้าส์ (บริษัทซีพี) ตามต้องการ (*ad libitum*) ในห้องปราศจากเชื้อ (clean rooom) ที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 1^{\circ}C$ และไฟปิดเปิดอัตโนมัติทุก 12 ชม ตามเวลากลางวันและกลางคืน กรงหนู และอาหารจะได้รับการเปลี่ยนใหม่ทุก 2 วัน

1.2 การเตรียมเซลล์จากม้าม

การเตรียมเซลล์เดี่ยว ๆ (single cell suspension) ของ lymphocytes จากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. พลีชีพ (sacrifice) หนู 1 กลุ่ม (ประมาณ 3-4 ตัว) ด้วยวิธีการหักกระดูกต้นคอ (cervical dislocation)
2. นำม้าม (spleen) ของหนูแต่ละตัวออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งกระทำโดยสเปรย์ alchohol ที่ตำแหน่งของม้าม ก่อนผ่าเอาม้ามออกด้วยกรรไกร และปากคีบปลอดเชื้อ นำม้ามทั้งหมดใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml ซึ่งบรรจุ EBSS (ภาคผนวก ก) ที่แช่เย็นไว้ที่ 4°C (ใช้ EBSS 3 ml ต่อ 1 ม้าม)

3. ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ เทม้ามที่อยู่ใน EBSS ลงใน petri plate ขนาด 60 x 15 mm และเตรียม single cell suspension โดยบดม้ามระหว่างส่วนปลายด้านที่ใช้เขียน (frosted end) ของ สไลด์ 2 แผ่น
4. ใช้ pasteur pipette ดูด EBSS ใน petri plate เพื่อชะเซลล์ที่อาจติดสไลด์ และดูดเซลล์ขึ้นลง (resuspend cell) อย่างนุ่มนวลเพื่อแยกเซลล์ที่เป็นกลุ่มเล็ก ๆ ให้แยกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ดูดเซลล์กลับเข้าสู่หลอด centrifuge เดิม
5. ปั่น (centrifuge) หลอดที่ความเร็ว 1,200 rpm, 4°C เป็นเวลา 5 นาที
6. เท supernatant ของเซลล์ออกและ resuspend เซลล์ใน complete RPMI media เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 Media

Complete media ที่ใช้ในการทดสอบ mitogenesis คือ RPMI -1640 (ภาคผนวก ก) ที่มี 10% FCS (ภาคผนวก ก), 15 mM Hepes และ 100 U/ml ของ penicillin และ streptomycin

1.4 วิธีทดสอบ mitogenesis

วิธีมาตรฐานของการทดสอบ mitogenesis วัดการแบ่งเซลล์ของ lymphocyte เพื่อตอบสนองต่อ mitogen โดยวัดปริมาณการสังเคราะห์ DNA ด้วยการใช้ thymidine ที่ปิดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (tritium labeled-thymidine [^{3}H-TdR]) แต่งานวิจัยนี้ ทดลองใช้ MTT แทนการใช้ [^{3}H-TdR] และวัด formazan product ที่แปรผันโดยตรงกับปริมาณ lymphocyte ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการแบ่งเซลล์เพื่อตอบสนองต่อ mitogen

1.4.1 ขั้นตอนการทดสอบ mitogenesis

รายละเอียดของขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เตรียม stock solution ของ mitogen Con A (1.5 mg/ml) LPS (10 mg/ml) และ pokeweed (5 mg/ml) ใน EBSS (ภาคผนวก ข)
2. พลีชีพหนู C57Bl/6 จำนวน 3-4 ตัว ในการทดลองแต่ละครั้ง นำม้ามมาเตรียม single cell suspension ของ lymphocyte ตามวิธีที่ระบุใน 1.2
3. ภายหลัง resuspend single cell suspension ของเซลล์ม้ามใน RPMI complete media (ใช้ 3 ml ต่อ 1 ม้าม) นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion (ภาคผนวก ค) และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีปริมาณตามต้องการ
4. สำหรับ mitogen LPS หรือ PWM ในแต่ละหลุมของ 96 well microtiter flat bottom plate ใส่ 25 µl complete media ในหลุมที่เป็น control หรือ 25 µl ของ mitogen (LPS

หรือ pokeweed) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และ ใส่ 100 µl เซลล์ ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 125 µl

5. สำหรับ ConA mitogen ในแต่ละหลุมของ 96 well microtiter flat bottom plate ใส่ 50 µl complete media ในหลุมที่เป็น control หรือ 50 µl ของ ConA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และ ใส่ 100 µl เซลล์ ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 150 µl
6. บ่ม plate ที่ 5% CO_2 incubator อุณหภูมิ 37°C
7. ภายหลังการบ่ม culture ตามระยะเวลาที่กำหนด นำแต่ละ plate มาวัดปริมาณเซลล์ของ lymphocte เมื่อถูกกระตุ้นด้วย mitogen โดยใช้ MTT colorimetric assay ตามวิธีในหัวข้อ 1.5

1.4.2 การทดลองหาความเข้มข้นของ mitogen ที่เหมาะสม

ในการทดลองหาความเข้มข้นของ LPS ที่เหมาะสม เตรียม LPS โดยเจือจางจาก stock solution ของ LPS ด้วย EBSS ให้มีความเข้มข้นที่ 5,000, 2,500, 500, 50 และ 5 µg/ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ LPS ในแต่ละหลุมเป็น 1,000, 500, 100, 10 และ 1 µg/ml ตามลำดับ

ในการทดลองหาความเข้มข้นของ PWM ที่เหมาะสม เตรียม PWM โดยเจือจางจาก stock solution ของ PWM ด้วย EBSS ให้มีความเข้มข้นที่ 500, 250, 125, 62.5 และ 6.25 µg/ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเป็น 100, 50, 25, 12.5 และ 1.25 µg/ml ตามลำดับ

ในการทดลองหาความเข้มข้นของ ConA ที่เหมาะสม เตรียม ConA โดยเจือจางจาก stock solution ของ ConA ด้วย EBSS ให้มีความเข้มข้นที่ 30, 15 และ 7.5 µg/ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเป็น 10, 5, และ 2.5 µg/ml ตามลำดับ

1.4.3 การทดลองหาปริมาณเซลล์ ที่เหมาะสม

สำหรับการทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทดสอบ ปรับความเข้มข้นเซลล์ให้เป็น $2x10^6$, $4x10^6$ และ $8x10^6$ cells/ml ด้วย complete RPMI media เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ในแต่ละหลุมเป็น $2x10^5$, $4x10^5$ และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม ตามลำดับ บ่มร่วมกับ mitogen

1.4.4 การทดลองหาระยะเวลา ที่เหมาะสม

ในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการตอบสนอง วัดการตอบสนองที่ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ภายหลังการกระตุ้นด้วย mitogen โดยนับวันที่ทำการทดลองเป็นวันที่ 0 และวันถัดมาเป็นวันที่ 1

1.5 MTT colorimetric assay

เตรียม stock solution ของ MTT 6 mg/ml โดยชั่ง MTT จำนวน 0.06 กรัมใน 8 ml PBS ใส่ใน beaker ที่หุ้ม aluminium foil กวนด้วย stirring rod จนละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ml ใน

volumetric flask ด้วย PBS (ภาคผนวก ก) และกรองให้ปราศจากเชื้อด้วยเยื่อกรอง cellulose nitrate (0.2 μm acrodisc) เก็บที่ 4 °C ใน centrifuge tube ที่หุ้มด้วย aluminium foil (MTT stock solution เก็บในที่มืด และ 4 °C ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์)

ภายหลังการบ่มเซลล์ตามระยะเวลาที่กำหนดของ mitogenesis assay วัดการเจริญของเซลล์โดยประเมินจากปริมาณเซลล์โดยหลักการ bioreduction ของ MTT ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. เมื่อครบระยะเวลาที่บ่ม ใส่ 25 μl MTT stock solution (6 mg/ml) ลงใน culture ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ MTT เป็น 1 mg/ml
2. นำ plate ที่เติม MTT แล้วไปบ่มใน 5% CO_2 incubator ที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 4 ชม.
3. ภายหลัง 4 ชม. นำ plate ไปส่องดูด้วย inverted microscope เพื่อสังเกตลักษณะรูปดาวของ formazan product ในแต่ละหลุม และปั่น plate ที่ 2,000 rpm. 10 นาที
4. ภายหลังการปั่น เทสารละลายออกจาก plate โดยการพลิก plate อย่างรวดเร็ว และซับสารละลายที่เหลือในแต่ละหลุมโดยคว่ำ plate บนกระดาษ tissue พร้อมทั้งเคาะเบา ๆ 2-3 ครั้ง ระวังอย่าให้ตะกอนสีม่วงของ formazan product ไหลออกจากหลุม
5. เติม 100 μl DMSO ลงในแต่ละหลุม และ pipette ขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งเพื่อละลายตะกอนของ formazan product ซึ่งจะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน ระวังอย่าให้เกิดฟอง (ในกรณีที่เกิดฟอง ให้นำ plate ไปปั่นที่ 1,000 rpm ประมาณ 3-4 นาที)
6. นำ plate ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ด้วย ELISA plate reader (Packard model AS10001)

2. การพัฒนาวิธีทดสอบ Mixed Lymphocyte Response

วิธีทดสอบมาตรฐานของ MLR วัดความสามารถของ responder cell ในการตอบสนองต่อ stimulator cell โดยวัดการสังเคราะห์ DNA ด้วยการใช้ [^{3}H]-TdR งานวิจัยนี้ดัดแปลงวิธีทดสอบโดยทดลองใช้ MTT แทนการใช้ [^{3}H-TdR] เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสี

2.1 สัตว์ทดลอง

หนูเม้าส์ C57Bl/6J และ DBA/2 เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถูกเลี้ยงที่อาคารสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 1.1

งานวิจัยนี้เลือกใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 เป็น responder และใช้เซลล์จากม้ามของหนู DBA/2 เป็น stimulator ตามวิธีมาตรฐานของการทดสอบด้าน immunotoxicology ของ National Toxicology Program ซึ่งเลือกใช้หนู B6C3F1 เป็น responder และ DBA/2 เป็น stimulator

เพราะเป็นคู่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมที่ major histocompatibility complex class II antigen โดย H-2 haplotype ของ B6C3F1 และ DBA/2 เป็น H-2^b และ H-2^d ตามลำดับ งานวิจัยนี้เลือกใช้ C57Bl/6 เป็น responder แทน B6C3F1 เพราะเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ B6C3F1 เป็น H-2^b haplotype เช่นเดียวกัน และในช่วงระยะเวลาที่ทำการวิจัยยังไม่สามารถหาหนูสายพันธุ์ B6C3F1 ได้ในประเทศไทย แต่ในปัจจุบัน สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เริ่มมีการจำหน่ายหนูสายพันธุ์ B6C3F1 ดังนั้น สามารถใช้เซลล์ม้ามจากหนูเม้าส์ B6C3F1 เป็น responder ได้เช่นกัน

2.2 Media

Complete media ที่ใช้ใน MLR (ภาคผนวก ก) คือ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS, 15 mM Hepes, 50 μM 2-mercaptoethanol (2-ME) (ภาคผนวก ข) และ 100 U/ml ของ penicillin และ streptomycin

2.3 วิธีทดสอบ mixed lymphocte response

งานวิจัยนี้เลือกใช้การทดสอบแบบ one-way mixed lymphocyte response ซึ่งวัดเฉพาะการตอบสนองของ responder cell ต่อ stimulator cell เท่านั้น โดยใช้ mitomycin C ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ stimulator cell เพราะให้ข้อมูลที่มีประโยชน์กว่าการทดสอบแบบ two-way mixed lymphocyte response และสามารถประยุกต์ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของ responder cell

2.3.1 ขั้นตอนการทดสอบ mixed lymphocyte response

รายละเอียดขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เตรียม stimulator cell โดยใช้ม้ามจากหนู DBA/2 จำนวน 4-5 ตัว เพื่อเตรียม single cell suspension ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 1.2 แต่ ภายหลังการปั่น resuspend เซลล์ใน 10 ml EBSS
2. นับ stimulator cell โดยใช้ trypan blue exclusion method ปรับความเข้มข้นของ viable cell ให้เป็น $2x10^7$ cell/ml ปิเปต 20-30 ml ของ $2x10^7$ cell/ml ใส่ใน 50 ml conical tube
3. เตรียม mitomycin C (5000 μg/ml) (ภาคผนวก ข) ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจาก mitomycin C เป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์
4. ใช้ 0.1 ml mitomycin C (5000 μg/ml) ต่อ 10 ml $2x10^7$ cell/ml stimulator cell เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ mitomycin C เป็น 50 μg/ml ห่อหลอดทดลองของ stimulator cell ที่ได้รับ mitomycin C ด้วย aluminium foil

5. นำเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C เข้าตู้บ่ม 37°C 5% CO_2 โดยคลายเกลียวของ conical tube เล็กน้อย บ่มเซลล์เป็นเวลา 45 นาที เขย่าหลอดอย่างนิ่มนวล ทุก ๆ 10 นาที ระหว่างช่วงเวลาการบ่ม
6. ระหว่างที่บ่ม stimulator cell เตรียม responder cell โดยใช้ม้ามจากหนู C57Bl/6 จำนวน 2-3 ตัว เตรียม single cell suspension จากม้ามตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 1.2 ภายหลังการปั่นเหวี่ยง resuspend เซลล์ใน complete media
7. นับจำนวน responder cell โดย trypan blue exclusion method และปรับความเข้มข้นของ viable cells ให้มีความเข้มข้นตามต้องการ เก็บเซลล์ไว้ที่ 4°C ระหว่างรอ stimulator cell
8. เมื่อครบกำหนดเวลา 45 นาที เขย่าหลอดทดลอง stimulator cell ที่ได้รับ mitomycin C อีกครั้งหนึ่งอย่างนิ่มนวล ทำการล้างเซลล์โดยใส่ 20 ml EBSS และนำไปปั่นทันทีที่ 1,200 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที
9. เมื่อสิ้นสุดการปั่น เท supernatant ออก และ resuspend เซลล์ใน 20 ml EBSS และทำการล้างเซลล์ซ้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าล้าง mitomycin C ที่ไม่ได้ถูกนำเข้าสู่เซลล์ (uptake) ออกจนหมด
10. หลังการล้างเซลล์ครั้งสุดท้าย resuspend stimulator cell ใน complete media นับและปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้นตามต้องการ
11. ในแต่ละหลุมของ 96 well microtiter U bottom plate ใส่เซลล์ดังต่อไปนี้คือ

    หลุมที่มี responder อย่างเดียว: 100 μl responder + 100 μl media

    หลุมที่มี responder + stimulator: 100 μl responder + 100 μl stimulator

    ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 μl
12. ปั่น plate ที่ประมาณ 600 rpm เป็นเวลา 5 นาที 4°C ก่อนนำเข้าบ่มในตู้บ่ม 37°C, 5% CO_2
13. เมื่อครบกำหนดเวลาของการบ่มใน MLR assay นำ plate สำหรับการทดสอบ mixed lymphocyte response วัดการตอบสนองโดยใช้ MTT ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 1.5

2.3.2 การหาปริมาณเซลล์และอัตราส่วน responder ต่อ stimulator ที่เหมาะสม

สำหรับการทดลองหาปริมาณเซลล์และอัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator cell ที่เหมาะสมใน MLR ทดลองใช้ responder : stimulator ในสัดส่วน 1:4 และ 1:5 โดยใช้ 100 μl ของ 2, 4, 8 และ $10x10^6$ cells/ml responder cell บ่มร่วมกับ 100 μl ของ 8, 16, 32 และ $40x10^6$ cells/ml stimulator cell ตามลำดับสำหรับอัตราส่วนของ responder: stimulator เท่ากับ 1:4 และบ่ม

ร่วมกับ 100 μl ของ 10, 20, 40 และ $50x10^6$ cells/ml stimulator cell ตามลำดับ สำหรับอัตราส่วนของ responder: stimulator เท่ากับ 1:5

2.3.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบ MLR

สำหรับการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสม วัดการตอบสนองภายหลังการบ่มเป็นระยะเวลา 4 และ 5 วัน โดยนับวันที่ทำการทดลองเป็นวันที่ 0 และถัดจากวันทำการทดลองเป็นวันที่หนึ่ง ในการทดลอง ใช้ปริมาณเซลล์ของ responder เป็น $4x10^5$ และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับเซลล์ stimulator $16x10^5$ และ $20x10^5$ เซลล์/หลุม (สำหรับ responder $4x10^5$ เซลล์/หลุม) และเซลล์ stimulator $32x10^5$ และ $40x10^5$ เซลล์/หลุม (สำหรับ responder $8x10^5$ เซลล์/หลุม) เพื่อให้ได้อัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator เป็น 1:4 และ 1:5 ตามลำดับ

2.3.4 การตอบสนองต่อ mitogen ของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C

เพื่อให้แน่ใจว่าการทดสอบเป็นแบบ one-way mixed lymphocyte response จึงตรวจผลยับยั้งของ mitomycin C ต่อการแบ่งเซลล์ของ DBA/2 stimulator cell โดยวัดการตอบสนอง ต่อ mitogen ตามวิธี mitogenesis assay ในหัวข้อ 1.4 อาจเลือกใช้ Con A หรือ LPS เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเป็น mitogen และเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ mitogen และของเซลล์ สำหรับโครงการวิจัยนี้เลือกใช้ Con A 5 μg/ml เป็น mitogen และเลือกใช้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น $4x10^5$ เซลล์/หลุม ในการทดสอบ ตัวอย่างการ plate เซลล์ ใน 96 well microtiter flat bottom plate เพื่อตรวจสอบการตอบสนองต่อ mitogen ของเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C เทียบกับเซลล์responder มีดังนี้คือ

100 μl responder cell + 50 μl media

100 μl responder cell + 50 μl Con A

100 μl mitomycin C-treated stimulator cell + 50 μl media

100 μl mitomycin C-treated stimulator cell + 50 μl Con A

นำ plate เข้าตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO_2 ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 2 วัน (นับวันที่เข้าตู้บ่มเป็น 0 วัน) นำ plate สำหรับการทดสอบ mitogenesis วัดการตอบสนองต่อ mitogen ด้วยการใช้ MTT ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 1.5

2.3.5 การตอบสนองต่อ mitogen ของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ หรือไม่ได้รับ mitomycin C

เพื่อให้แน่ใจว่า stimulator เซลล์ที่เตรียมจากหนู DBA/2 สามารถตอบสนองต่อ mitogen ได้ จึงทำการเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ mitogen ของ stimilator เซลล์ที่ได้รับ หรือไม่ได้รับ mitomycin C ในการทดลองใช้ เซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม กระตุ้นด้วย Con A 5 μg/ml และวัดการตอบสนองที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ตัวอย่างการ plate เซลล์ ใน 96 well microtiter flat bottom plate มีดังนี้คือ

100 μl untreated stimulator cell + 50 μl media

100 μl untreated stimulator cell+ 50 μl Con A

100 μl mitomycin C-treated stimulator cell + 50 μl media

100 μl mitomycin C-treated stimulator cell + 50 μl media

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่วัดเป็นค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่ 590 nm ± standard error mean (SEM) โดยมีจำนวนซ้ำของการทดลองเท่ากับ 3 ข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variances) ด้วยการใช้โปรแกรม Statistical Pakage for the Social Sciences (SPSS) เปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่มจากกลุ่มควบคุมโดย least square test (LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test สำหรับการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีเฉพาะ 2 กลุ่มใช้ independent T test ข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$