

บทที่ 3

วิธีการศึกษาวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกฉีดยาอินซูลิน
2. feeding tube
3. กรรไกรผ่าตัด ปากคีบสำหรับผ่าหนู
4. หลอดทดลองพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
5. เครื่อง Homogenizer (Janke&Kunkel IKA[®] Labortechnik)
6. centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. บีปัดอัตโนมัติขนาด 10, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
8. เครื่องปั่นแยกตะกอนของเหลว (ABBOTT)
9. คิวเวต (QUARTZ CELL 10 mm STANDARD type 1)
10. เครื่อง Ultraviolet - Visible Spectrophotometry
11. เครื่อง Thermal Cycler (GeneAmp[®] PCR system 2700)
12. Gel electrophoresis set (BIO-RAD)
13. เครื่องผสมน้ำยาในหลอดทดลอง (บริษัทเฟิร์มโมสติก บิอสสเอนต)
14. Gel Doc

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ไนโตรเจนเหลว
2. TRIzol[®] Reagent
3. Chloroform
4. Isopropyl alcohol
5. DEPC water (Diethylpyrocarbonate)
6. 3 M NaOAc
7. ethanol
8. Primer [Oligo dT] (Invitrogen)
9. First strand Buffer (Invitrogen)
10. 2.5 mM dNTPmix
11. 0.1 mM Dithiothreitol (Invitrogen)
12. Enzyme Superscript II (Invitrogen)
13. (10X) PCR buffer

14. 25 mM MgCl_2
15. Sense primer ของ Beta-actin (ลำดับเบส 5'-GTGACAGCATTGCTTCTGTG-3')
16. Antisense primer ของ Beta-actin (ลำดับเบส 5'-ATGTGACTGCACTCTGGCAA-3')
17. Sense primer ของ HNF-1 α (ลำดับเบส 5'-CTTAGGACCTGCAACTCATG-3')
18. Antisense primer ของ HNF-1 α (ลำดับเบส 5'-TCTGTCAGTACACACGACAC-3')
19. Deionized water
20. Taq enzyme (Promega Madison Wisconsin, USA)
21. Mineral oil
22. Dye
23. N,N'-Methylenbisacrylamide
24. TAE (1X)
25. TAE (50X)
26. 10% ammonium peroxidesulfate
27. N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Fisher Biotech)
28. 1% ethidium bromide (Fisher Biotech)



วิธีการศึกษาวิจัย

ข้อมูลเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นหนูขาวเล็ก (mice) มีรายละเอียดดังนี้

1. สายพันธุ์ ICR
2. น้ำหนัก 28-36 g
3. เก็บในห้องเลี้ยงหนูที่เป็นระบบปิด มีอากาศถ่ายเท ความชื้นอุณหภูมิในห้องเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง
4. แยกชั่ง 2 ตัวต่อ 1 กรง

การเตรียมมะเร็งชั้นก

1. นำผงมะเร็งชั้นกที่แกะออกจากแคปซูลไปชั่งน้ำหนัก ให้มีน้ำหนัก 0.1, 1 และ 3 g ตามลำดับ
2. นำผงมะเร็งชั้นกที่ชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในบีกเกอร์
3. เติมน้ำปริมาตร 25 ml ลงในบีกเกอร์
4. ตั้งบีกเกอร์ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง
5. คูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกเพื่อนำไป feed ให้หนู

การเตรียมสัตว์ทดลอง

1. เตรียมสัตว์ทดลองโดยงดอาหารหนู 12 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง
2. แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม คือ
 - กลุ่มที่ 1 ให้น้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาทีก่อนทำการสกัดแยก RNA จากตับ
 - กลุ่มที่ 2 ให้กลูโคสขนาด 1.5 g/kg น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 นาทีก่อนทำการสกัดแยก RNA จากตับ
 - กลุ่มที่ 3 ให้มะเร็งชั้นกขนาด 0.1 g/kg น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 นาทีก่อนให้กลูโคส หลังจากนั้น 30 นาที จึงทำการแยกสกัด RNA จากตับ
 - กลุ่มที่ 4 ให้มะเร็งชั้นกขนาด 1 g/kg น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 นาทีก่อนให้กลูโคส หลังจากนั้น 30 นาที จึงทำการแยกสกัด RNA จากตับ
 - กลุ่มที่ 5 ให้มะเร็งชั้นกขนาด 3 g/kg น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 นาทีก่อนให้กลูโคส หลังจากนั้น 30 นาที จึงทำการแยกสกัด RNA จากตับ

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1. ทำให้นุตายโดยวิธีเคลื่อนกระดูกคอ (cervical dislocation)
2. เก็บตัวอย่างตับของหนูโดยวิธีการเปิดผ่าช่องท้องในแนวยาวกลางลำตัว
3. ล้างตัวอย่างตับด้วย 0.9 % NaCl แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว
4. ตัดตัวอย่างตับให้มีน้ำหนักประมาณ 500 mg ใส่ลงใน homogenize tube และเติม TRIzol[®] ปริมาตร 3 ml
5. นำตัวอย่างตับไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จนเนื้อเยื่อตับละเอียด

6. ปิเปตตัวอย่างดับที่ปั่นละเอียดแล้ว ปริมาตร 1 ml ใส่ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
7. ปิเปตคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 μ l ใส่ใน eppendorf เขย่าผสม 15 วินาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที
8. นำตัวอย่างดับไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,900 rpm เป็นเวลา 18 นาที
9. ดูดส่วนใสด้านบนออกมาในปริมาตร 1/2 ของส่วนใสทั้งหมด ซึ่งเป็นส่วน RNA sample ใส่ใน eppendorf ปิเปตคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 μ l นำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,900 g เป็นเวลา 4 นาที
10. ทำซ้ำในข้อ 9 อีก 1 ครั้ง และดูดส่วนใสด้านบนออกมาใส่ eppendorf ใหม่
11. ปิเปต isopropyl alcohol ปริมาตร 500 μ l ใส่ลงใน RNA sample ที่ได้ในข้อ 10 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 10,900 g เป็นเวลา 10 นาที
12. ดูดส่วนใสทิ้ง จนเหลือแต่ตะกอน
13. เติม DEPC water ปริมาตร 100 μ l เพื่อละลายตะกอน ทำให้ได้สารละลาย RNA
14. ดูดสารละลาย RNA ปริมาตร 4 μ l ผสมกับ DEPC water 996 μ l (อัตราส่วน 1 : 250) ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ไปวัดหาปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง UV visible spectrophotometry
15. เก็บสารละลาย RNA ที่ยังไม่ได้เจือจางไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำในขั้นตอนต่อไป

การหาปริมาณ RNA

1. นำสารละลาย RNA ที่ทำการเจือจางด้วย DEPC water อัตราส่วน 1:250 มาวัดหาปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometry โดยใช้ DEPC water 1,000 μ l เป็น blank
 2. วัดการดูดกลืนแสงในช่วง 250 - 320 nm
 3. วัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ 260 nm
 4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ RNA (ค่า OD)
- $$\text{RNA concentration} = \text{OD} \times 40 \times 250 \text{ ng}/\mu\text{l}$$
- $$= \text{OD} \times 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

การล้าง phenol ที่ปนเปื้อนในสารละลาย RNA

การล้าง phenol จะทำเมื่อ peak การดูดกลืนแสงของ สารละลาย RNA เกิน 260 nm

1. นำสารละลาย RNA ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาใส่คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากัน และนำไป centrifuge เป็นเวลา 3 นาที
2. ดูดส่วนใสด้านบนออกใส่ใน eppendorf ใหม่
3. เติม 3 M NaOAc ปริมาตร 30 μ l (1 ใน 10 ของปริมาตร sample)
4. เติม EtOH 2.5 เท่าของปริมาตร sample นำไป centrifuge ที่ 10,900 g เป็นเวลา 15 นาที
5. ดูดส่วนใสทิ้ง จนเหลือแต่ตะกอน
6. เติม DEPC water ปริมาตร 100 μ l เพื่อละลายตะกอน ทำให้ได้สารละลาย RNA

7. ดูดสารละลาย RNA ปริมาตร 4 μ l ผสมกับ DEPC water 996 μ l (อัตราส่วน 1 : 250) ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ไปวัดหาปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง UV visible spectrophotometry
8. เก็บสารละลาย RNA ที่ยังไม่ได้เจือจางไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำในขั้นตอนต่อไป

การเตรียม cDNA จาก mRNA โดยวิธี RT-PCR

1. บีบเปิด สารละลาย RNA ให้มีปริมาณ RNA 2 μ g ลงใน microtube เติม Primer [Oligo dT] ปริมาตร 1 μ l และ DEPC water ลง โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 9 μ l
2. นำ microtube ที่เตรียมพร้อมแล้วใส่ในเครื่อง Thermal cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ตั้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายละเอียดต่อไปนี้ ดูดสารละลายแต่ละชนิดตามปริมาณที่กำหนดเรียงตามลำดับ ใส่ลงใน microtubes ที่ได้จากข้อ 2 แล้วผสมให้เข้ากัน

1 st Strand Buffer	4 μ l
2.5 mM dNTPmix	4 μ l
0.1 mM DTT	2 μ l
Enzyme (Superscript II)	1 μ l
ปริมาตรรวม	20 μ l
4. นำ microtube ที่เตรียมพร้อมแล้วใส่ในเครื่อง Thermal cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็น 60 นาที

ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็น 10 นาที

จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. จากข้อ 4 จะได้ cDNA product

การทำ PCR ของ beta-actin

1. เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการต่อไปนี้ ดูดสารละลายแต่ละชนิดตามปริมาณที่กำหนดเรียงตามลำดับ ใส่ลงใน microtubes แล้วผสมให้เข้ากัน

cDNA product	1 μ l
(10X) PCR buffer	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1 μ l
2.5 mM dNTPmix	1 μ l
sense primer ของ beta-actin	1 μ l
antisense primer ของ beta-actin	1 μ l
DI water	4.5 μ l
Taq enzyme	0.5 μ l
ปริมาตรรวม	10 μ l
2. นำ microtube ที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge

3. หยด mineral oil 1 หยด ทับบนสารละลายที่ผสมแล้วเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำในขณะที่อยู่ในเครื่อง Thermal cycler
4. นำ microtube ที่เตรียมพร้อมแล้วใส่ในเครื่อง Thermal cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้
 - 4.1 เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที
 - 4.2 ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
Annealing	68 องศาเซลเซียส	0.5 นาที
Extension	68 องศาเซลเซียส	2 นาที

 ทำซ้ำ 33 รอบ
 - 4.3 เมื่อครบรอบสุดท้าย ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นเก็บ microtube ที่มี PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. เติมหอโลโฟลัม ปริมาตร 100 μ ลงใน microtube ที่มี PCR product
6. ดูด bubble ซึ่งเป็นส่วน DNA ออกมาใส่ tube ใหม่
7. เติม dye ปริมาตร 2 μ ลง ผสมให้เข้ากัน
8. นำไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis ต่อไป

การทำ PCR ของ HNF-1 α

1. เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการต่อไปนี้ ดูดสารละลายแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนด เรียงตามลำดับ ใส่ลงใน microtubes แล้วผสมให้เข้ากัน

cDNA product	1 μ
(10X) PCR buffer	1 μ
MgCl ₂ (25 mM)	1 μ
2.5 mM dNTPmix	1 μ
sense primer ของ HNF-1 α	1 μ
antisense primer ของ HNF-1 α	1 μ
DI water	4.5 μ
Taq enzyme	0.5 μ
ปริมาตรรวม	10 μ
2. นำ microtube ที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge
3. หยด mineral oil 1 หยด ทับบนสารละลายที่ผสมแล้วเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำในขณะที่อยู่ในเครื่อง Thermal cycler
4. นำ microtube ที่เตรียมพร้อมแล้วใส่ในเครื่อง Thermal cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้
 - 4.1 เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที
 - 4.2 ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลา ดังนี้



สำนักหอสมุด
มหาวิทยาลัยสุโขทัย

Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
Annealing	68 องศาเซลเซียส	0.5 นาที
Extension	68 องศาเซลเซียส	2 นาที
ทำซ้ำ 33 รอบ		

4.3 เมื่อครบรอบสุดท้าย ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นเก็บ microtube ที่มี PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 100 μ ลงใน microtube ที่มี PCR product
6. ดูด bubble ซึ่งเป็นส่วน DNA ออกมาใส่ tube ใหม่
7. เติม dye ปริมาตร 2 μ ลง ผสมให้เข้ากัน
8. นำไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis ต่อไป

17 ส.ค. 2547

4970124

การเตรียม polyacrylamide gel

1. เติมส่วนผสมตามรายการต่อไปนี้

DI water	4.8 ml
Polyacrylamide	0.9 ml
TAE (50X)	120 μ l
10% ammonium peroxidesulfate	180 μ l
TEMED	3 μ l

2. เท gel ลงระหว่าง แผ่นแก้วที่ให้เตรียมแล้ว ใส่หัว
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 45 นาที
4. นำไปทำ electrophoresis ต่อไป

วิธีการทำ gel electrophoresis

1. เมื่อเตรียมแผ่น gel เรียบร้อยแล้ว นำแผ่น gel ไปติดตั้งกับเครื่องแบบ vertical electrophoresis โดยเติม (1X) TAE buffer ใน chamber บนให้ท่วมหัว ดึงหัวออก
2. ทำการ pre-run ที่ 40 volt เป็นเวลานาน 10 นาที
3. หยด marker ปริมาตร 3 μ l และ DNA ที่ผสม dye แล้ว ปริมาตร 8 μ l ลงในช่อง gel โดยใช้ปิเปตอัตโนมัติ บันทึกการหยด DNA ลงในช่อง gel ตามลำดับให้เรียบร้อย ทั้งในส่วนช่อง beta-actin และ HNF-1 α
4. ต่อเข้าเครื่องกับ power supply แล้ว ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีขนาด 120 volt รอจนกระทั่งสีเคลื่อนที่ได้ระยะทางเท่าที่ต้องการจึงปิดเครื่อง
5. นำ gel ที่ได้ ไปย้อมสีด้วย ethidium bromide (1% ethidium bromide 1 μ l ใน TAE (1X) 200 ml) เป็นเวลานาน 30 นาที
6. นำ gel ที่ได้ไปหาปริมาณการแสดงออกของ HNF-1 α ด้วยเครื่อง Densitometer หรือ Gel doc