บทที่ 3
วิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

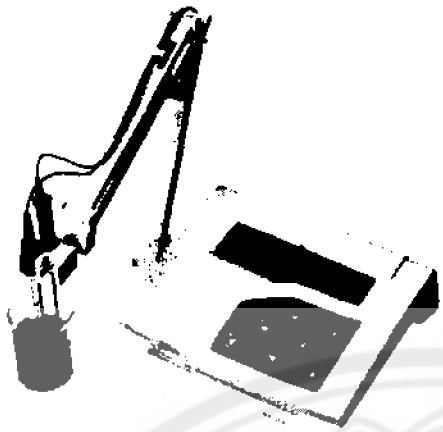
เครื่องมือ

- beaker
- cylinder
- magnetic bar
- PH meter (รูปที่ 3-1)
- laminar air flow
- vortex
- เครื่องกรองความดัน
- กระดาษกรอง
- ขวดแก้วบรรจุสาร
- กระดาษฟอยด์
- ตู้แช่แข็ง
- ตู้เย็น
- refrigerated centrifuge (รูปที่ 3-2)
- micro pipette (รูปที่ 3-3)
- sterile eppendorf tube (รูปที่ 3-4)
- incubator

สารเคมี

- สารสกัดสมุนไพร
- RPMI (รูปที่ 3-5)
- $NaHCO_3$ 2 g/l
- penicillin-streptomycin
- LPS
- DMSO
- Dexamethasone inj. 4mg/ml

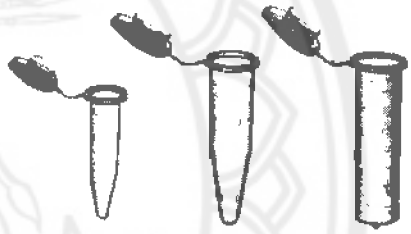
รูปแสดงวัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี



รูปที่ 3-1 PH meter

รูปที่ 3-2 refrigerated centrifuge

รูปที่ 3-3 micro pipette



รูปที่ 3-4 sterile eppendorf tube

รูปที่ 3-5 RPM

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (RPMI medium)(23)

a. เติม RPMI 1 ซองลงใน beaker และ rinse ภายในซอง
b. เติม $NaHCO_3$ 2 g/l และ sterile water ปริมาตร 50 ml
c. ผสมให้เข้ากันโดยการใช้เครื่องผสมแม่เหล็กไฟฟ้า
d. ปรับปริมาตรด้วย sterile water จนได้ปริมาตรประมาณ 900 ml
e. ปรับ pH ด้วย pH meter ให้ได้ pH 7.4
f. นำเข้าไปเตรียมต่อในตู้ laminar air flow
g. เติม penicillin-streptomycin ปริมาตร 1 ml
h. กรองสารละลายโดยใช้เครื่องกรองความดัน ผ่าน filter ขนาด 0.22 µm
i. เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นปิดฝา และ seal ด้วยกระดาษฟอยด์
j. เก็บในตู้เย็น 4 °C เพื่อรอเติม serum ก่อนนำไปใช้

Whole blood method (24)

1. เตรียม sterile eppendorf tube
2. เติม RPMI 900 µl ใส่ลงในแต่ละ eppendorf
3. เติมสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด 10 µl ใส่ลงใน eppendorf แล้วผสมให้เข้ากัน
4. เติมเลือด (blood 9 ส่วน ต่อ 3.8% sodium citrate 1 ส่วน) 100 µl ผสมให้เข้ากัน
5. incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง
6. เติม LPS ความเข้มข้น 1×10^{-6} g/ml 10 µl ผสมให้เข้ากัน
7. incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง
8. centrifuge ที่ 4 °C 5000 g นาน 3 นาที
9. ปิเปตเก็บส่วน supernatant ครั้งละ 400 µl จำนวน 2 ครั้ง ใส่ลงใน eppendorf
10. นำไปแช่เย็น เก็บไว้ที่ -20 °C

การเตรียม Positive control

เติม Dexamethasone inj. 4mg/ml ปริมาณ 10 µl แทนสารสกัดตัวอย่าง

การเตรียม Negative control

เติม 100% DMSO ปริมาณ 10 µl แทนสารสกัดตัวอย่าง

การเตรียม Unstimulated

เติม 100% DMSO ปริมาณ 10 µl แทนสารสกัดตัวอย่าง หลังจาก incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมงแล้ว ไม่ต้องเติม LPS ความเข้มข้น 1×10^{-6} g/ml

ELISA

Experimental procedure of IL-1B ELISA (25)

1. Coat well plate ด้วย capture antibody ใน coating buffer ปริมาณ 100 µl/ well of capture antibody

วิธีคำนวณ จาก 1 plate ใช้ capture antibody 48 µl ลงใน coating buffer 12 cc

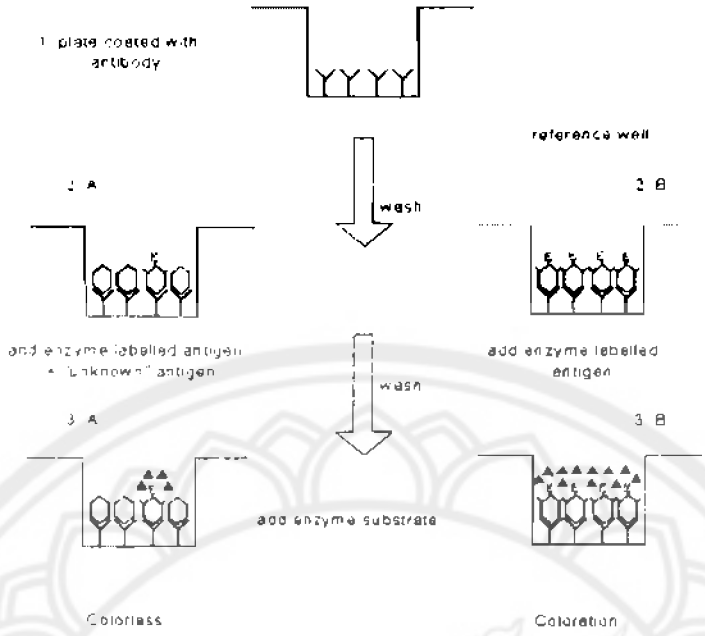
จาก 120 cc ใช้ 10X coating buffer 12 cc

12 cc ใช้ 10X coating buffer (12*12) /120 = 1.2 cc

ดังนั้นต้องเติมน้ำกลั่นลงไปอีก 12 -1.2 = 10.8 cc

วิธีทำ

1. เทน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 20 cc ลงใน beaker ขนาด 100 cc
2. ใช้ pipette ดูดน้ำกลั่นใส่ลงใน sterile tube 10 cc และใช้ micropipette ดูดน้ำกลั่นลงใน sterile tube อีก 0.8 cc
3. ใช้ micropipetteดูด coating buffer ปริมาตร 1.2 cc ออกจากขวดโดยตรง
4. ปล่อย coating buffer ลงใน sterile tube
5. นำ sterile tube ไปปั่นโดยใช้เครื่อง vortex ประมาณ 2-3 นาที
6. ใช้ micropipette ดูด capture antibody มาปริมาตร 48 µl
7. นำ sterile tube ไปปั่นด้วยรอบที่ต่ำที่สุดของเครื่อง vortex จนสารละลายเข้ากันดี
8. นำ 96 –well plate มาวางบนกระดาษที่ mark ตำแหน่งการใส่สารไว้
9. เทสารละลายใน sterile tube ลง reagent reservoir
10. ใช้ multichannel micropipette ดูดสารละลายจาก reagent reservoir ครั้งละ 100 µl (ดูดแบบ two step แต่กดจังหวะเดียว)
11. ปล่อยสารละลายลงด้านข้างของหลุม จนครบทุกหลุม
12. นำ 96 –well plate มาใส่ถุงพลาสติก และปิดถุงให้มิดชิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C 1 คืน



รูปที่ 3-6 วิธีการทำ ELISA

2. **ดูดสารใน** plate **ออกและล้างด้วย** wash buffer **ปริมาณ** 300 µl/well **ประมาณ** 3 **ครั้ง จากนั้นให้กลับ** plate **และซับด้วยกระดาษเพื่อเอา** buffer **ส่วนเกินออก**

วิธีการเตรียม ELISA wash buffer

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1 1 * PBS
2. Tween 20 NF grade
3. beaker 1000 ml 1 ใบ
4. beaker 50 ml 1 ใบ
5. ขวดแก้วสำหรับใส่สาร 1 ขวด

วิธีคำนวณ

ถ้าจะเตรียม Tween 20 ปริมาตร 100 ml จะต้องใช้ 0.05 ml

ถ้าจะเตรียม Tween 20 ปริมาตร 500 ml จะต้องใช้ 0.25 ml

วิธีเตรียม

1 ตวง 1* PBS ปริมาณ 500 ml ใส่ลงใน beaker ขนาด 1000 ml

2. ใช้ micropipette ดูด Tween 20 ใส่ลงใน beaker ขนาด 1000 ml

วิธีปฏิบัติการ

1 เท ELISA wash buffer ปริมาตรประมาณ 100 ml ลงใน reagent reservoir

2 คว่ำ96 –well plate เพื่อทิ้ง antibody ออก

3. ใช้ mutichannel micropipette ดูด wash buffer จาก reagent reservoir มา 290 µl

4. หยอดสารละลายให้ครบทุกหลุม

5. นำ 96 well plate ไปคว่ำที่อ่างน้ำ ให้สารละลายออกไปมากที่สุด

6. นำ plate ที่คว่ำแล้ว ไปตบบน tissue ที่เตรียมไว้ เพื่อเป็นการซับสารละลายให้ออกจนหมด

7. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 2 ถึง 5 อีก 2 ครั้ง

3. **ยึด plate ด้วย 1 เท่า assay diluent ปริมาณ 200 µl/well และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง**

วิธีการเตรียม Assay diluent

วิธีคำนวณ

1 หลุม ใช้ 200 µl

96 หลุม ใช้ 200 * 96 = 1800 µl =1.8 ml เตรียมเผื่อเป็น 22 ml

จาก protocol 50 ml ใช้ assay diluent ปริมาตร 10 ml

ถ้าใช้ 22 ml ใช้ assay diluent ปริมาตร = (10*22)/50 = 4.4 ml

วิธีเตรียม

1. เทน้ำกลั่นปริมาตร 15.6 ml ลงใน beaker ขนาด 100 ml

2. เติม assay diluent ปริมาตร 4.4 ml ลงใน beaker ผสมให้เข้ากัน

วิธีปฏิบัติการ

1. เท assay diluent ลงใน reagent reservoir

2. ใช้ mutichannel pipette ดูด assay diluent มาครั้งละ 200 µl/หลุม ปล่อยลงแต่ละแถวของ 96 –well plate

3. ตั้ง 96 –well plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

4. คว่ำ 96 –well plate เพื่อทิ้ง assay diluent ออก

5. wash 96 –well plate ด้วย washing buffer อีก 3 ครั้ง

วิธีการเตรียม standard ของ IL-1β

1. เติม standard solution 2 µl ลงใน assay diluent ปริมาตร 4 ml
2. Dilute 5 ความเข้มข้น โดยการนำ eppendrof tube มาเรียงกัน เติม assay diluent ลงไปหลอดละ 250 µl
3. Pipette standard solution ความเข้มข้น 500 pg/ml ปริมาตร 250 µl ลงในหลอดที่ 2
4. นำไป Vortex เบาๆ
5. ทำการ dilute ไปเรื่อยๆจนได้ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 pg/ml ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดสอบ Test compounds ด้วย ELISA

1. เติม standard และ Test compounds ในหลุมที่ design ไว้ โดยเติมหลุมละ 100 µl
2. Seal plate และ incubate plate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. Wash plate ด้วย wash buffer 5 ครั้ง
4. เติม detection antibody ที่ dilute ใน 1 x assay diluent หลุมละ 100 µl
5. Seal plate และ incubate plate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. Wash pate ด้วย wash buffer 5 ครั้ง
7. เติม Avidin - HRP ที่ dilute ใน 1 x assay diluent หลุมละ 100 µl
8. Seal plate และ incubate plate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
9. Wash plate 7 ครั้ง โดยครั้งที่ 7 ให้แช่ wash buffer เป็นเวลานาน 1 นาที
10. เติม substrate solution หลุมละ 100 µl จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
11. เติม stop solution 2 N sulfuric acid หลุมละ 50 µl
12. นำ plate ไปอ่านด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm
13. วิเคราะห์ผลการทดลอง