บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hoods)
2. ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
5. ชุดอุปกรณ์แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis)
6. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
7. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
8. เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR)
9. เครื่องชั่งสารเคมี
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
11. เครื่อง Universal Microplate Reader
12. Microplate shaker
13. Water bath
14. Vortex
15. Auto pipette
16. Pipette aid
17. ตะเกียงแก๊ส
18. เครื่องทำน้ำกลั่น
19. เครื่อง qPCR ยี่ห้อ CFX96 Touch

วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

1. Cell culture plastic flask
2. 96 wells plate
3. 6 wells plate
4. ขวดแก้ว

5. Tube
6. Beaker
7. Pipettes
8. Pipette tips

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (Eagle's minimum essential medium)
2. FBS (fetal bovine serum)
3. penicillin/streptomycin antibiotic
4. สารละลาย paraquat
5. สารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide)
6. สารละลาย MTT (3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltrazoliumbro-mide)
7. Phosphate buffered saline (PBS)
8. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
9. Trypsin
10. elthanol 75%
11. DEPC water
12. Ethidium bromide
13. Agarose gel
14. iTaq ™ Universal SYBR ® Green Supermix

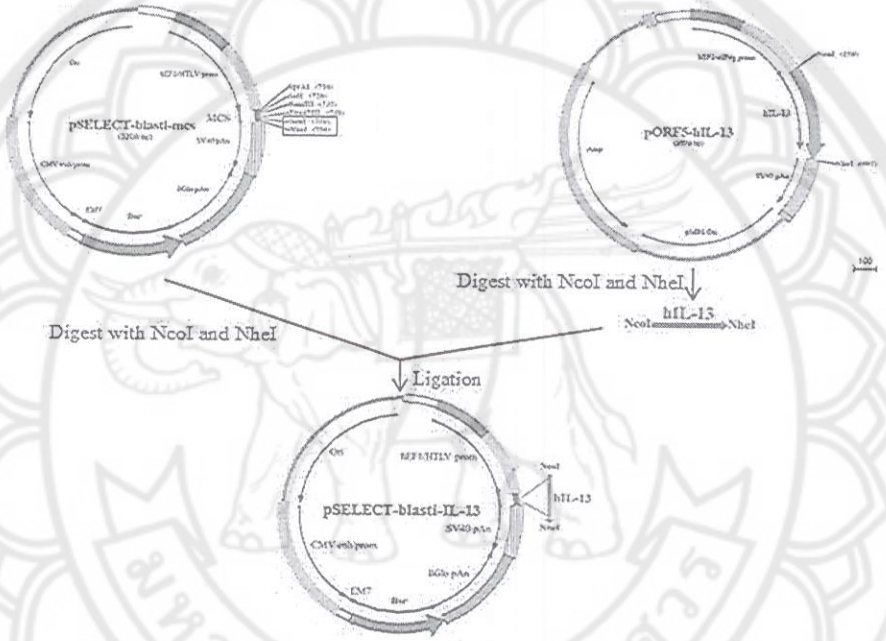
วิธีดำเนินการวิจัย

1. **การเพิ่มจำนวนพลาสมิดpORF5-hIL-13 และpSELECT-blasti-mcs**

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α (Promega, USA) ที่มีพลาสมิด pORF5-hIL-13 (InvivoGen, USA) ในอาหาร Luria Bertani (LB) broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (PAA, Austria) และ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิดpSELECT-blasti-mcs (InvivoGen, USA) ในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ blasticidin S (InvivoGen, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัด NucleoSpin® Plasmid QuickPure (MACHEREY-NATGELGmbH & Co. KG, Germany) ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอิเลคโตโฟลีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo scientific, USA)

2. การโคลนยีนอินเตอร์ลูคิน-13 (IL-13)

ตัดชิ้นยีน IL-13 จากพลาสมิด pORF5-hIL-13 และตัด pSELECT-blasti-mcs expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NheI และ NcoI (Fermentas, USA) จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นยีน IL-13 ที่ได้เข้าสู่เวคเตอร์ pSELECT-blasti-mcs โดยใช้ T4 DNA ligase (Fermentas, USA) ที่อุณหภูมิ 4 °C16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*E.coli* สายพันธุ์ DH5α) ทำการคัดเลือก *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม pSELECT-blasti-IL-13 บน LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ Blasticidin S



ภาพ 17 แผนภาพแสดงการโคลนยีน IL-13 เข้าสู่เวคเตอร์ pSELECT-blasti-mcs

3. การตรวจสอบ pSELECT-blasti-IL-13

ตรวจสอบ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α (Promega, USA) ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 จาก colony ที่ได้จาก LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ Blasticidin S ด้วยการนำมาสกัดพลาสมิค pSELECT-blasti-IL-13 ด้วยวิธี rapid alkaline lysis จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของ pSELECT-blasti-IL-13 โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ NheI และ NcoI และเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน IL-13 คือ forward primer 5'-ATG GCG CTT TTG TTG -3' และ reverse primer 5'- GTT GAA CTG TCC CTC GCG A -3' ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตโฟลีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

4. หาลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน IL-13

ส่ง pSELECT-blasti-mcs-IL-13 ไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน IL-13 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank

5. การเลี้ยงเซลล์ SK-N-SH

Human neuroblastoma cell (SK-N-SH) (HBT-11: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) เซลล์ต้นกำเนิดได้มาจากสมองผู้ป่วยโรค neuroblastoma (มะเร็งชนิด malignant solid tumor ที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยเด็ก) มีการเจริญแบบเกาะติดกับพื้นผิว (adhere) การเลี้ยงเซลล์ SK-N-SH ในอาหารเพาะเลี้ยง MEM (minimum essential medium) (PAA, Austria) ที่มี 10% FBS (fetal bovine serum) 100 µg/ml (PAA, Austria) Penicillin/Streptomycin (PAA, Austria) โดยเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 อัตราส่วนต่อเชื้อ (Sub cultivation) 1:3 ถึง 1:8 เปลี่ยนอาหารใหม่สัปดาห์ละ 1-2 ครั้ง

6. การนำ recombinant IL-13 plasmid เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH

นำเซลล์ SK-N-SH จำนวน 4 x 10^5 cells/well มาเพาะเลี้ยงในอาหารMEM ที่มี 10% FBS และ 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin ใน 6 well plate ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนำ pSELECT-blasti-mcs และ pSELECT-blasti-IL-13 เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH โดยใช้ Nanofectin kit (PAA, Austria) หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ SK-N-SH ที่มีpSELECT-blasti-mcs และ pSELECT-blasti-mcs-IL-13 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็นอาหารที่มียาปฏิชีวนะBlasticidin S ผสมอยู่ โดยเปลี่ยนทุกๆ 2-3 วัน เป็นเวลา 2-3 อาทิตย์

7. ตรวจสอบการแสดงออกของยีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH ที่ระดับ mRNA

เลี้ยง SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มีpSELECT-blasti-mcs (vector transfected) ซึ่งถูกเลือกใช้เป็นกลุ่ม Control และSK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) ลงใน 6 well plate โดยเซลล์มีความหนาแน่น 3x10^5cells/well บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ทำการสกัด total RNA จากเซลล์โดยใช้ชุดสกัด easy-RED™ (iNtRON biotechnology, Korea) เปลี่ยน total RNA ที่สกัดได้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์สำเร็จรูป RevertAid™ Reverse Transcriptase enzyme (Fermentas, USA) จากนั้นนำ cDNA มาทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน IL-13 และ primer ที่จำเพาะต่อยีน GAPDH ซึ่งใช้เป็น internal control ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเลคโตโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ความเข้มของ band ที่เกิดขึ้นโดยใช้โปรแกรม ImageJ2x นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตาราง 2 แสดงไพรเมอร์ GAPDH และ IL-13 ที่ได้ทำการออกแบบไว้

Gene		Primer sequence (5'->3')	Accession no.	PCRproduct
GAPDH	F	AGGTCGGAGTCAACGGATTTG	NM_002046.3	532 bp
	R	GTGATGGCATGGACTGTGGT		
IL-13	F	ATGGCGCTTTTGTTG	NM_002188.2	396 bp
	R	GTTGAACTGTCCCTCGCGA		

หมายเหตุ: F=forward primer R=reverse primer

8. ตรวจสอบการแสดงออกของIL-13 ในเซลล์ SK-N-SH ที่ระดับโปรตีน

เลี้ยงSK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มีpSELECT-blasti-mcs (vector transfected) ซึ่งถูกเลือกใช้เป็นกลุ่ม Control และSK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) ลงใน 6 well plate โดยเซลล์มีความหนาแน่น 3 x 10^5cells/well บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์โดยใช้ RIPA Cell Lysis Buffer (AMRESCO Inc., USA) จากนั้นหาปริมาณของโปรตีนด้วยวิธีการ Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, USA) นำโปรตีนที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนมาทำการแยกผ่านsodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลไปยังแผ่น PVDF membrane (Merck Millipore, USA) นำแผ่น PVDF membranes ไปเติม 5% skim milkทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปบ่มกับ mouse anti-IL-13 IgG (primary antibody) (Merck Millipore, USA) ความเข้มข้น 1:1,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มกับ horseradish peroxidase anti-mouse IgG (secondary antibody) (AMRESCO Inc., USA) ความเข้มข้น 1:1,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม DAB substrate ของเอนไซม์ horseradish peroxidase (AMRESCO Inc., USA) ทำการวิเคราะห์ความเข้มของ band ที่เกิดขึ้นโดยใช้โปรแกรม ImageJ2x นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

9. ทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของ paraquat ต่อเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13

ทดสอบความเป็นพิษของสาร paraquat ต่อSK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector transfected) และ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) โดยการทำ MTT assay ใช้เซลล์ที่ความหนาแน่น 3 x 10^4

cells/well เลี้ยงลงใน 96 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เติมสารทดสอบ paraquat ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 100, 250, 500, 750 และ 1,000µM ที่ละลายในอาหาร serum free media และให้อาหาร serum free media ที่ไม่เติมสารparaquat เป็นกลุ่ม Controlทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 จากนั้นเติมสารละลาย MTT (3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltrazoliumbromide) ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด เติมสารละลาย DMSO ลงไปหลุมละ 100 µl ทำการเขย่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

10. การศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง APP และ α-syn ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เลี้ยง SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector transfected) และ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) ลงใน 6 well plate โดยเซลล์มีความหนาแน่น 3 x 10^5cells/well บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารทดสอบ paraquat ในระดับความเข้มข้น 250 µM และ 500 µM ที่ละลายในอาหาร serum free media และให้อาหาร serum free media ที่ไม่เติมสาร paraquat เป็นกลุ่ม Control ทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน APP และ α-syn โดยทำการสกัด total RNA จากเซลล์โดยใช้ชุดสกัด easy-RED™ (iNtRON biotechnology, Korea) เปลี่ยน total RNA ที่สกัดได้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์สำเร็จรูป RevertAid™ Reverse Transcriptase enzyme (Fermentas, USA) จากนั้นนำ cDNA มาทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนAPP และ primer ที่จำเพาะต่อยีน GAPDH ซึ่งใช้เป็น internal control ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเลคโตโฟลีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานทำการวิเคราะห์ความเข้มของ band ที่เกิดขึ้นโดยใช้โปรแกรม ImageJ2x นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตาราง 3 แสดงไพรเมอร์ GAPDH, APP และ α-syn ที่ได้ทำการออกแบบไว้

Gene		Primer sequence (5'->3')	Accession no.	PCRproduct
GAPDH	F	AGGTCGGAGTCAACGGATTTG	NM_002046.3	532 bp
	R	GTGATGGCATGGACTGTGGT		
APP	F	TGGGAGTGAAGACAAAGTAGTAG	NM_000484.3	407 bp
	R	CCTGGGTAGTCTTGAGTAAACTT		
α-syn	F	GCCTTCTGCCTTTCCACCCTCGT	NM_000345.3	342 bp
	R	CTCCCTGCTCCCTCCACTGTCTT		

หมายเหตุ: F=forward primer R=reverse primer

11. **การศึกษาการแสดงออกของยีน α-synuclein ด้วยวิธี Real time PCR (qPCR)**

11.1 **การศึกษา**Annealing temperature**ที่เหมาะสมกับ primer ด้วยวิธี** real time PCR

นำตัวอย่าง cDNA มาทำการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real time PCR ด้วยชุด iTaq Universal SYBR Green Supermix และ primer ที่จำเพาะต่อยีน α-synuclein และ GAPDH โดยกำหนดค่า annealing temperature ที่ 3 อุณหภูมิคือ 56°C, 59 °Cและ 62°C ทำการเลือกอุณหภูมิที่มีความไวต่อปฏิกิริยามากที่สุด (sensitivity) โดยดูจากค่า Quantification Cycle (Cq) ที่ให้ค่าน้อยที่สุด

11.2 **การศึกษา** Melting Curve Analysis **ด้วยวิธี** qPCR

Melting curve เกิดภายหลังจากปฏิกิริยา qPCR เสร็จสิ้นแล้ว หลักการของค่า melting curve คือการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ DNA สายคู่คลายออกเป็นสายเดี่ยวครึ่งหนึ่งหรือ 50% ทำให้ SYBR Green หลุดออกมาจาก DNA สายคู่ด้วย ส่งผลให้สัญญาณ fluorescence ลดลงด้วย เมื่อ นำมาสร้างกราฟจะได้ลักษณะเป็น peak ออกมา melting curve ขึ้นอยู่กับค่า melting temperature (Tm) ซึ่งแปรผันโดยตรงกับ % GC และ nucleotide content ของ PCR product ที่เกิดขึ้น การเกิด primer-dimer หรือเกิด non specific ของไพรเมอร์ จะทำให้ได้ melting curve ออกมามีลักษณะหลาย peak ทำให้การวิเคราะห์ผลการความผิดพลาด หรือทำให้ efficiency ของปฏิกิริยาลดลง ดังนั้น PCR product ที่มีความจำเพาะต่อยีน ต้องให้ melting curve ออกมาเป็นลักษณะ peak เดียวโดยสภาวะที่ใช้คือ polymerase activation & DNA

denaturation 98°C นาน 3 นาที, denaturation 95 °C นาน 10 วินาทีและ annealing/extension 59 °C นาน 40 วินาที จำนวนรอบที่ใช้คือ 40 รอบ ตั้งค่า melting temperature ที่ 65°C-95°C ในเครื่อง qPCR ยี่ห้อ CFX96 Touch (*BIO-RAD*)

11.3 การศึกษาค่า Efficiency ของ primer ด้วยวิธี qPCR

นำตัวอย่าง cDNA มาทำการศึกษาEfficiency ของ primerด้วยวิธี Real time PCR โดยทำการเจือจาง cDNA แบบ ten-fold dilution3 ความเข้มข้น คือ 1, 1:10 และ 1:100 แล้วนำ cDNA ที่ถูกเจือจางนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real time PCR ด้วยชุด iTaq Universal SYBR Green Supermix และ primer ที่จำเพาะต่อยีน α-syn และ GAPDHโดยสภาวะที่ใช้คือ polymerase activation & DNA denaturation 98°C นาน 3 นาที, denaturation 95 °C นาน 10 วินาทีและ annealing/extension 59 °C นาน 40 วินาที จำนวนรอบที่ใช้คือ 40 รอบด้วยเครื่อง qPCR ยี่ห้อ CFX96 Touch หลังจากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่า Efficiency ผ่านโปรแกรม Bio-Rad CFX Manager

11.4 การศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง α-synuclein ด้วยวิธี qPCR

เลี้ยง SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector transfected) และ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) ลงใน 6 well plate โดยเซลล์มีความหนาแน่น 3 x 10^5cells/well บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารทดสอบ paraquat ในระดับความเข้มข้น 250 µM ละลายในอาหาร serum free media และให้อาหาร serum free media ที่ไม่เติมสาร paraquat เป็นกลุ่ม Control ทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 จากนั้นทำการแยกสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัด easy-RED™เปลี่ยน total RNA ที่สกัดได้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์สำเร็จรูป RevertAid™ Reverse Transcriptase enzyme (Fermentas, USA) นำ cDNA มาตรวจสอบด้วยวิธี qPCR โดยชุดทดลอง iTaq Universal SYBR Green Supermix และ primer ที่จำเพาะต่อยีน GAPDH และ α-syn ด้วยเครื่อง qPCR ยี่ห้อ CFX96 Touchโดยสภาวะที่ใช้คือpolymerase activation & DNA denaturation 98°C นาน 3 นาที, denaturation 95 °C นาน 10 วินาทีและ annealing/extension 59 °C นาน 40 วินาที จำนวนรอบที่ใช้คือ 40 รอบ วิเคราะห์ผลผ่านโปรแกรม Bio-Rad CFX Manager โดยกำหนดให้วิเคราะห์ melting temperature ทุกครั้ง

ตาราง 4 แสดงไพรเมอร์ GAPDH และ α-syn ที่ได้ทำการออกแบบไว้

Gene		Primer sequence (5'->3')	Accession no.	PCRproduct
GAPDH	F	AGGTCGGAGTCAACGGATTTG	NM_002046.3	532 bp
	R	GTGATGGCATGGACTGTGGT		
α-syn	F	GCCTTCTGCCTTTCCACCCTCGT	NM_000345.3	342 bp
	R	CTCCCTGCTCCCTCCACTGTCTT		

หมายเหตุ: F=forward primer R=reverse primer

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดยใช้ One way analysis of variance (ANOVA) วิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's test เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)