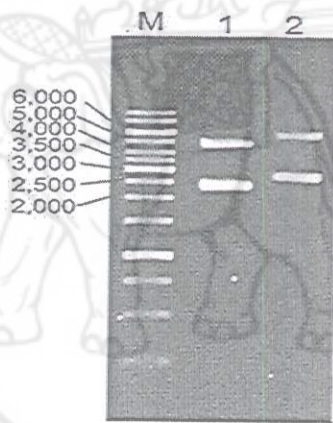


บทที่ 4

ผลการวิจัย

การเพิ่มจำนวนพลาสมิด pORF5-hIL-13 และ pSELECT-blasti-mcs

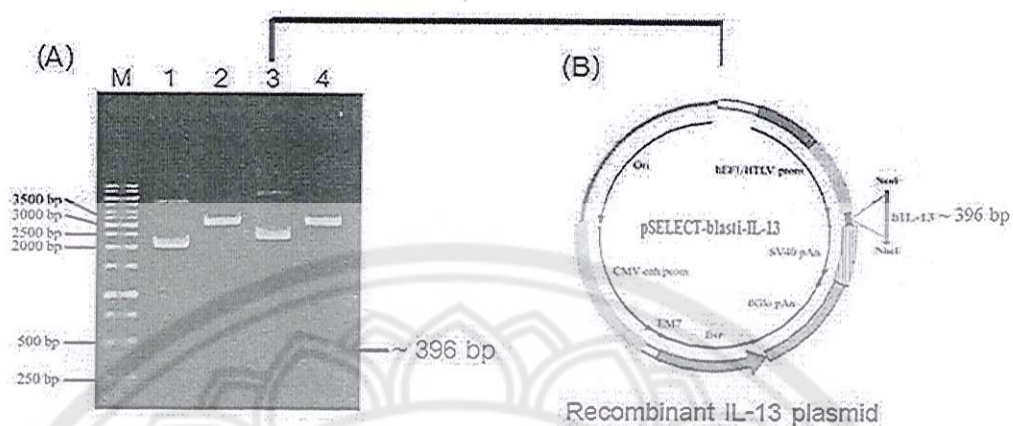
จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่มีพลาสมิด pORF5-hIL-13 ในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่มีพลาสมิด pSELECT-blasti-mcs ในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ blasticidin S จากนั้นสกัดพลาสมิดตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟเรซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า pORF5-hIL-13 มีขนาด 3,579 bp และ pSELECT-blasti-mcs มีขนาด 3,208 bp ตามลำดับ



ภาพ 18 แสดงผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด pORF5-hIL-13 และ pSELECT-blasti-mcs
lane M: 1kb DNA ladder, lane 1: pSELECT-blasti-mcs, lane 2: pORF5-hIL-13

การโคลนยีนอินเตอร์ลิวคิน-13 (IL-13)

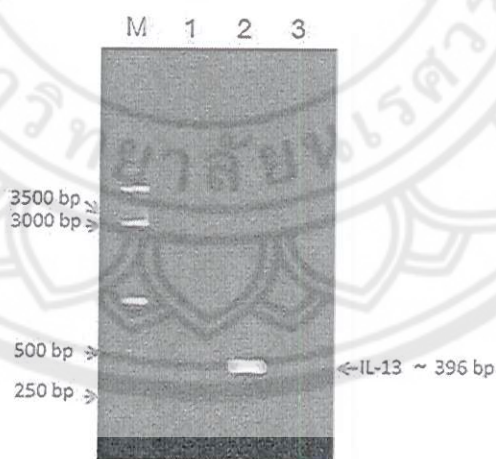
จากการตัดชิ้นยีน IL-13 จากพลาสมิด pORF5-hIL-13 และตัด pSELECT-blasti-mcs expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NheI และ NcoI จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นยีน IL-13 ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pSELECT-blasti-mcs ที่เป็น eukaryotic expression vector ตรวจสอบความถูกต้องของ pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant plasmid) ที่ได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ NheI และ NcoI ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟเรซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ยีน IL-13 เป้าหมายขนาดประมาณ 396 bp ดังภาพและเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน IL-13 ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟเรซิส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน



ภาพ 19 แสดงผลการการตัด IL-13 recombinant plasmid ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ NheI และ NcoI

(A) Lane M: 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA), Lane 1: pSELECT-blasti-mcs vector, Lane 2: pSELECT-blasti-mcs vector ตัดด้วย NheI/NcoI, Lane 3: pSELECT-blasti-IL-13 และ Lane 4: pSELECT-blasti-IL-13 ตัดด้วย NheI/NcoI

(B) โครงสร้างของ Recombinant IL-13 plasmid (pSELECT-blasti-IL-13)



ภาพ 20 แสดงผลของ PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน IL-13

ตรวจสอบ Lane M: 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA), Lane 1: Negative control, Lane 2: pSELECT-blasti-IL-13 และ Lane 3: pSELECT-blasti-mcs vector

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IL-13

จากการโคลนชิ้นยีน IL-13 ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pSELECT-blasti-mcs vector สำเร็จแล้วทำการสกัดพลาสมิด pSELECT-blasti-IL-13 จาก *E.coli* ไปหาลำดับเบสโดยวิธี DNA sequencing จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BioEditversion 7.1.3.0 และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกัน 100% ดังภาพ

```

gi|297787|emb|X69079.1|          GGCCTCATGGCGCTTTTGTGACCACGGTCAITGGCTCTCACTTGCCTTGG 100
pORF5-hIL-13                    -----CRIGGCGCTTTTGTGACCACGGTCAITGGCTCTCACTTGCCTTGG 45
Recombinant-IL-13                -----CRTGGCGCTTTTGTGACCACGGTCAITGGCTCTCACTTGCCTTGG 45
*****

gi|297787|emb|X69079.1|          CGGCTTTGCCTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCRGGGAGC 150
pORF5-hIL-13                    CGGCTTTGCCTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCRGGGAGC 95
Recombinant-IL-13                CGGCTTTGCCTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCRGGGAGC 95
*****

gi|297787|emb|X69079.1|          TCATGAGGAGCTGGTCAACATCACCCAGAACCCAGAGGCTCCGCTCTGC 200
pORF5-hIL-13                    TCATGAGGAGCTGGTCAACATCACCCAGAACCCAGAGGCTCCGCTCTGC 145
Recombinant-IL-13                TCATGAGGAGCTGGTCAACATCACCCAGAACCCAGAGGCTCCGCTCTGC 145
*****

gi|297787|emb|X69079.1|          AATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGC 250
pORF5-hIL-13                    AATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGC 195
Recombinant-IL-13                AATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGC 195
*****

gi|297787|emb|X69079.1|          AGCCCTGGATCCCTGATCACCGTGTGAGGCTGCACTGCGATCGAGAGAG 300
pORF5-hIL-13                    AGCCCTGGATCCCTGATCACCGTGTGAGGCTGCACTGCGATCGAGAGAG 245
Recombinant-IL-13                AGCCCTGGATCCCTGATCACCGTGTGAGGCTGCACTGCGATCGAGAGAG 245
*****

gi|297787|emb|X69079.1|          CCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACAGGCTCTCACTGGGCGAG 350
pORF5-hIL-13                    CCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACAGGCTCTCACTGGGCGAG 295
Recombinant-IL-13                CCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACAGGCTCTCACTGGGCGAG 295
*****

gi|297787|emb|X69079.1|          TTTTCCAGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCAGTTTGT 400
pORF5-hIL-13                    TTTTCCAGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCAGTTTGT 345
Recombinant-IL-13                TTTTCCAGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCAGTTTGT 345
*****

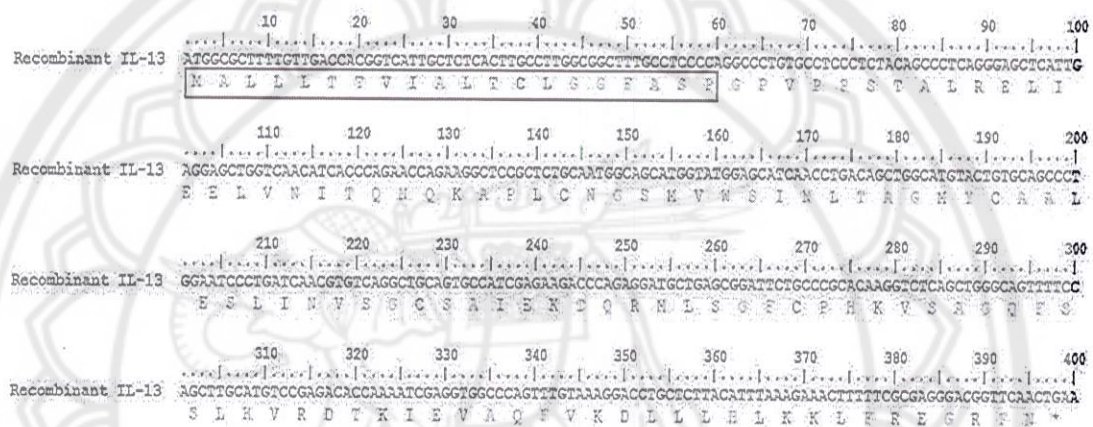
gi|297787|emb|X69079.1|          AAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTCGGAGGGGACGGTTCA 450
pORF5-hIL-13                    AAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTCGGAGGGGACGGTTCA 395
Recombinant-IL-13                AAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTCGGAGGGGACGGTTCA 395
*****

gi|297787|emb|X69079.1|          ACTGAACCTCGAAGCATCATTTTITGCRGAGACAGGACCTGACTATTG 500
pORF5-hIL-13                    ACTGAACCTCGAAGCATCATTTTITGCRGAGACAGGACCTGACTATTG 440
Recombinant-IL-13                ACTGAACCTCGAAGCATCATTTTITGCRGAGACAGGACCTGACTATTG 440
*****

```

ภาพ 21 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน Recombinant IL-13, pORF5-hIL-13 และ accession no. x69079.1 ซึ่งได้จากฐานข้อมูล NCBI

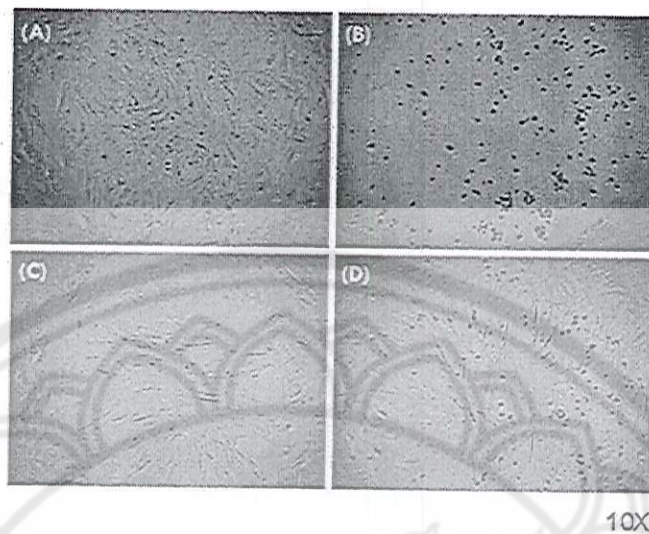
นำลำดับเบสที่เริ่มจากรหัสเริ่มต้น ATG จนถึง TGA ของรหัสหยุดใน expression vector ในส่วนของยีน IL-13 เปลี่ยนลำดับเบสเป็นกรดอะมิโน พบว่ามีกรดอะมิโน 132 ตัวจากขนาดของ ยีน 396 bp ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.1.3.0 แล้วนำไปเทียบกับโปรตีน IL-13 จาก ฐานข้อมูลใน GenBank พบมีความเหมือนกัน 100% ดังภาพ 22 โดยมีตำแหน่งของกรดอะมิโน ที่เป็น signal peptide 20 ตัว ซึ่งเป็นตัวช่วยในการขนส่ง IL-13 cytokines ออกนอกเซลล์เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของ cytokine ภายนอกเซลล์



ภาพ 22 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IL-13 ในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง signal peptide

ผลการนำ Recombinant IL-13 plasmid เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH

จากการนำเซลล์ pSELECT-blasti-mcs และ pSELECT-blasti-IL-13 เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH โดยใช้ Nanofectin kit (PAA, Austria) หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs และ pSELECT-blasti-mcs-IL-13 โดยใช้อาหารที่มียาปฏิชีวนะ Blasticidin S ผสมอยู่ โดยเปลี่ยนทุกๆ 2-3 วัน เป็นเวลา 2-3 อาทิตย์ พบว่าเฉพาะเซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector) และ pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (Recombinant IL-13) เท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้

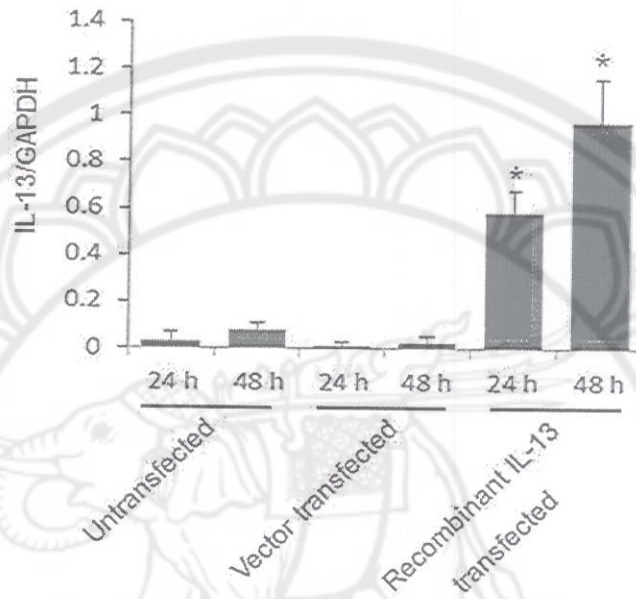
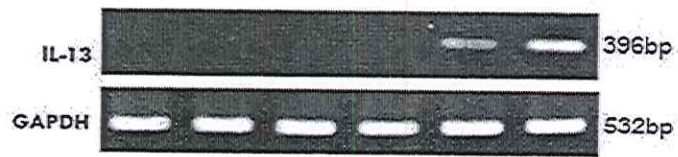


ภาพ 23 แสดงผลการคัดเลือก recombinant IL-13 และ expression vector เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH

(A) SK-N-SH cells, (B) SK-N-SH cells +Blasticidin S, (C) SK-N-SH transfected pSELECT-blasti-mcs +Blasticidin S, (D) SK-N-SH transfected pSELECT-blasti-IL-13 +Blasticidin S

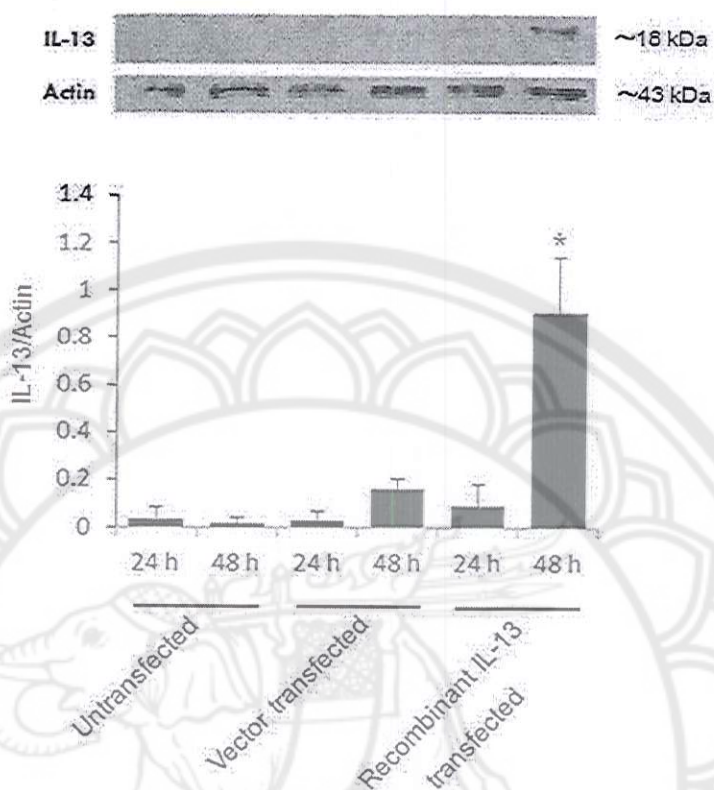
ผลการแสดงออกของยีนและโปรตีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH

เพื่อดูการแสดงของ recombinant IL-13 ใน mammalian SK-N-SH cells ทำการนำ pSELECT-blasti-mcs และ pSELECT-blasti-IL-13 เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH โดยใช้ Nanofectin kit จากนั้นคัดเลือกเซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs และ pSELECT-blasti-IL-13 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ Blasticidin S จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ IL-13 ในระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน IL-13 ด้วยวิธี western blot ทั้งในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector transfected) ซึ่งถูกเลือกใช้เป็นกลุ่ม Control และ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) พบว่า recombinant IL-13 transfected ที่มีการแสดงออกของยีน IL-13 และโปรตีน IL-13 สูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control พบว่ายีน IL-13 มีขนาด 396 bp และโปรตีน IL-13 มีขนาดประมาณ 18.5 kDa



ภาพ 24 ผลการแสดงออกของยีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (Recombinant IL-13) ในแต่ละช่วงเวลา

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เทียบกับกลุ่ม control (mean \pm SD)



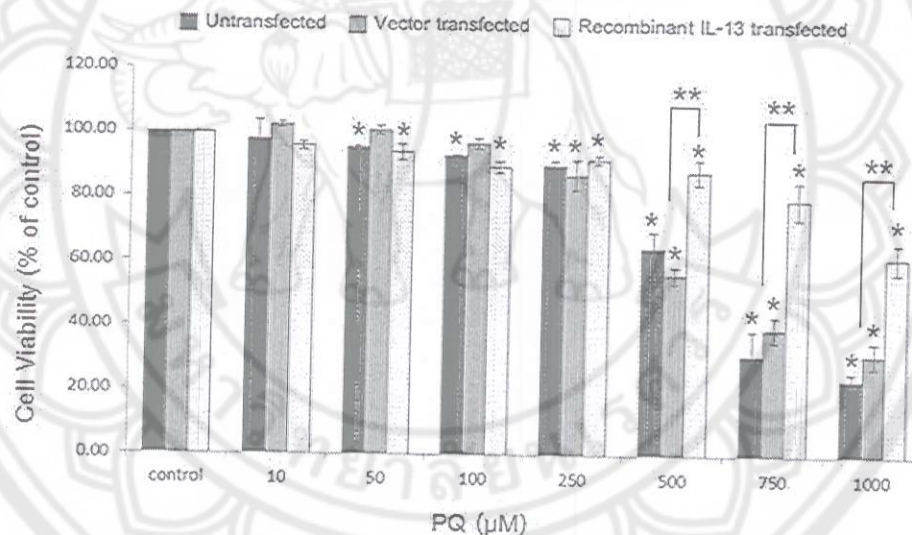
ภาพ 25 ผลการแสดงผลของโปรตีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มีพลาสมิด pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (Recombinant IL-13) ในแต่ละช่วงเวลา

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เทียบกับกลุ่ม control (mean \pm SD)

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

จากการทดสอบความเป็นพิษของสาร paraquat ต่อ 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) โดยการเติมสารทดสอบ paraquat ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 μ M ที่ถูกละลายในอาหาร serum free media และให้อาหาร serum free media ที่ไม่เติมสาร paraquat เป็นกลุ่ม Control ทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT assay พบการตายของเซลล์เป็นไปแบบ dose-dependent โดยค่าความมีชีวิตของ

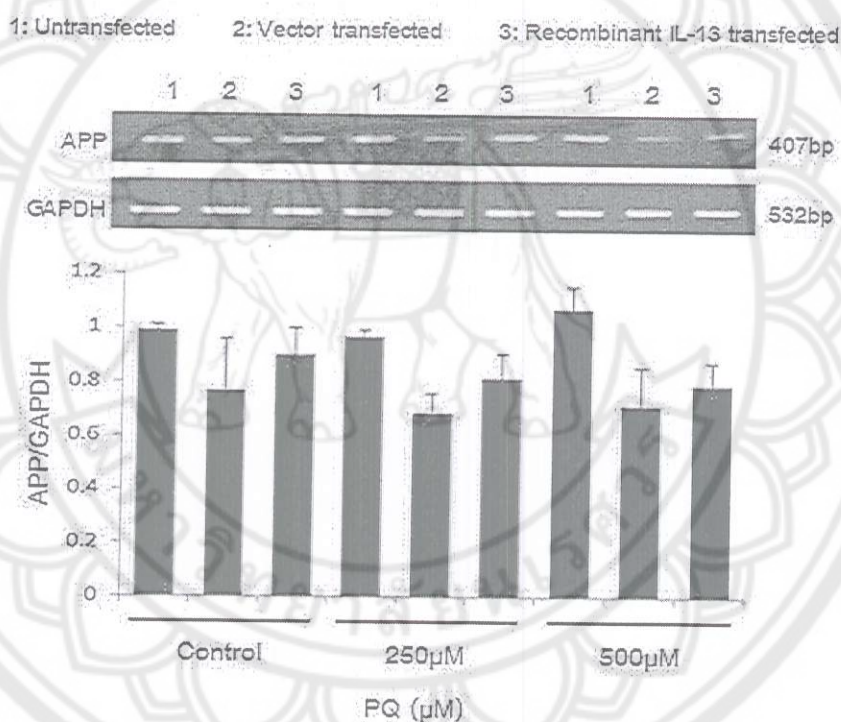
เซลล์ Untransfected อยู่ที่ $97.83 \pm 5.80\%$, $95.13 \pm 0.55\%$, $92.67 \pm 0.26\%$, $90.09 \pm 1.33\%$, $64.31 \pm 5.17\%$, $30.89 \pm 7.81\%$ และ $23.41 \pm 2.31\%$ ตามลำดับ ค่าความมีชีวิตของเซลล์ vector transfected อยู่ที่ $105.47 \pm 5.33\%$, $106.77 \pm 7.09\%$, $104.22 \pm 9.16\%$, $87.08 \pm 4.58\%$, $56.01 \pm 2.67\%$, $39.14 \pm 3.92\%$ และ $31.16 \pm 3.831\%$ ตามลำดับ และค่าความมีชีวิตของเซลล์ recombinant IL-13 transfected อยู่ที่ $97.70 \pm 1.16\%$, $93.82 \pm 2.43\%$, $89.42 \pm 1.70\%$, $91.79 \pm 1.33\%$, $88.05 \pm 3.86\%$, $79.34 \pm 5.68\%$ และ $61.52 \pm 4.52\%$ ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($*P < 0.05$) และที่ความเข้มข้นในกลุ่มเดียวกันตั้งแต่ 500, 750 และ 1,000 μM ของสาร paraquat เซลล์ recombinant IL-13 transfected มีค่าการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์ Untransfected และเซลล์ vector transfected แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($**P \leq 0.01$)



ภาพ 26 ผลของของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfected ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ตรวจวัดค่าความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบการตายของเซลล์เป็นไปแบบ dose-dependent แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($*P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และ ($**P \leq 0.01$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน (mean \pm SD)

ผลการศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง Amyloid precursor protein (APP) ด้วยวิธีการ RT-PCR

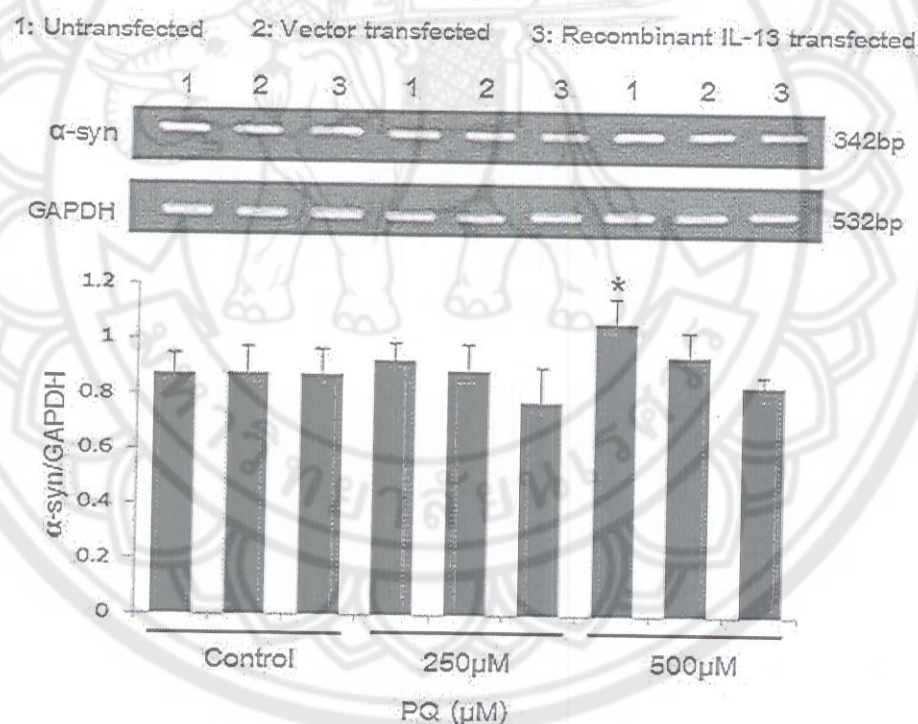
จากผลการศึกษาจากผลการศึกษาในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected) เซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector transfected) และเซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) ที่ได้รับสาร paraquat ในระดับความเข้มข้น 250 μ M และ 500 μ M นานเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มของ control ที่ไม่ได้รับสาร paraquat พบมีการแสดงของยีน APP ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ดังภาพ



ภาพ 27 การแสดงออกของยีน APP ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มีพลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มีพลาสมิด pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (IL-13 transfected) ต่อการได้รับสาร paraquat 250 μ M และ 500 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (mean \pm SD)

ผลการศึกษามวลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง α -synuclein (α -syn) ด้วยวิธีการ RT-PCR

จากผลการศึกษาในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected) เซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector transfected) และเซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) ที่ได้รับสาร paraquat ในระดับความเข้มข้น 250 μ M และ 500 μ M นานเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มของ control ที่ไม่ได้รับสาร paraquat พบว่าที่ได้รับสาร paraquat ในระดับความเข้มข้น 250 μ M มีการแสดงของยีน α -syn ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control แต่ในส่วนของที่ได้รับสาร paraquat ในระดับความเข้มข้น 500 μ M ในเซลล์ Untransfected มีการแสดงของยีน α -syn สูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ดังภาพ



ภาพ 28 การแสดงออกของยีน α -syn ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (IL-13 transfected) ต่อการได้รับสาร paraquat 250 μ M และ 500 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง* คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เทียบกับกลุ่ม control (mean \pm SD)

ผลการศึกษาของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง α -synuclein (α -syn) ด้วยวิธีการ qPCR

ยืนยันความจำเพาะของปฏิกิริยา qPCR

ในการศึกษาการแสดงออกยีนด้วยวิธี qPCR โดยใช้ SYBR Green ในการจับกับ DNA สายคู่แล้วปล่อยสัญญาณ fluorescence ออกมา จำเป็นจะต้องมีการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา qPCR ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธีการศึกษา annealing temperature ที่เหมาะสมกับ primer ทำ melting curve analysis เพื่อยืนยันความจำเพาะของ PCR products ที่เกิดขึ้นต่อไพรเมอร์ที่ใช้ และวิธีการทำ standard curve เพื่อยืนยันความมีประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน PCR product ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา qPCR

ค่า Annealing temperature ของ PCR product จากปฏิกิริยา qPCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real time PCR ด้วยชุด iTaq Universal SYBR Green Supermix และใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน α -synuclein และ GAPDH โดยการหาค่า annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมโดยกำหนดอุณหภูมิ 3 อุณหภูมิคือ 56 °C, 59 °C และ 62 °C ได้ค่า quantification cycle (Cq) values ของแต่ละอุณหภูมิดังนี้

ตาราง 5 แสดงค่า Cq ของ primer ที่จำเพาะต่อยีน α -synuclein และ GAPDH จากการศึกษา Annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมกับ primer

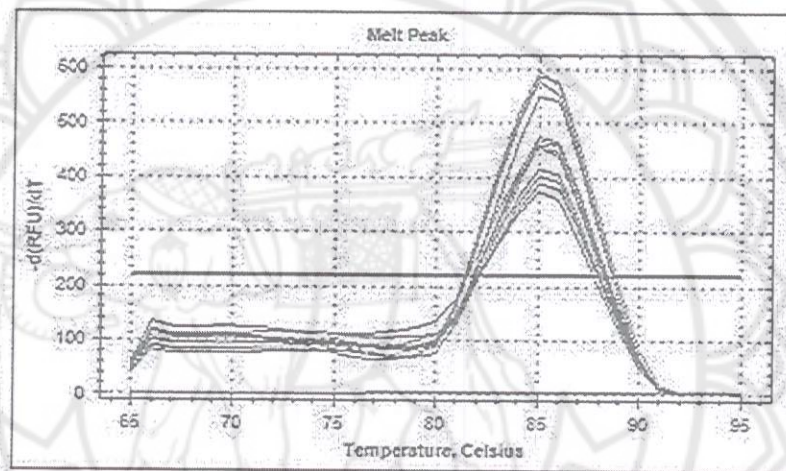
Primer Gene	Ta	Cq
α -syn	56 °C	23.01
	59 °C	22.80
	62 °C	23.01
GAPDH	56 °C	17.31
	59 °C	16.52
	62 °C	16.03

เลือกอุณหภูมิของค่า Ta ที่มีความไวต่อปฏิกิริยามากที่สุด (sensitivity) โดยดูจากค่า Cq ที่น้อยที่สุด ในที่นี้เลือกค่า Ta 59 °C ที่มีค่า Cq ของ α -synuclein เท่ากับ 22.80 และเลือกค่า Ta ของ GAPDH ซึ่งเป็น reference gene ให้เหมือนกับ α -synuclein ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย

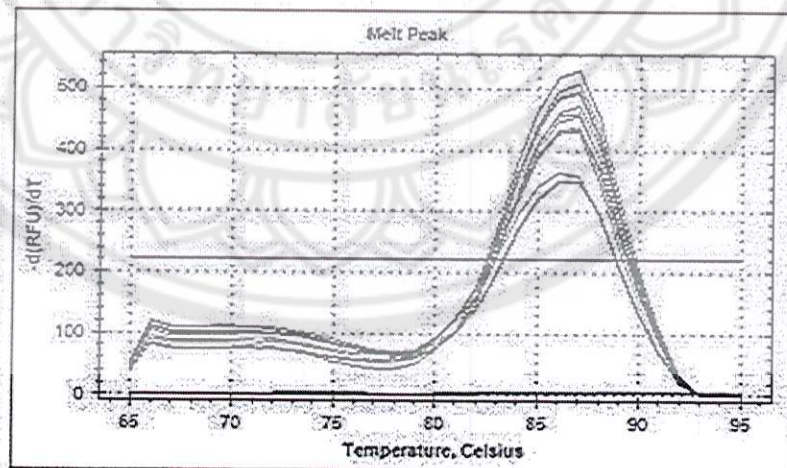
ค่า Melting curve analysis ของ PCR product จากปฏิกิริยา qPCR

จากผล melting curve analysis พบว่าค่า T_m ของ PCR product ของยีน α -syn คือ 85°C และค่า T_m ของ PCR product ของยีน GAPDH คือ 87°C ซึ่งจาก melting curve ที่ได้มีลักษณะเป็น peak เดี่ยว ไม่พบการเกิด primer-dimer และ non-specific PCR product ใดๆ จากทั้ง 2 ยีน ดังนั้น PCR product ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา qPCR โดยการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 ยีน จึงมีความจำเพาะ ดังภาพ

(A)



(B)



ภาพ 29 แสดง melting curve analysis ของ PCR product (A) α -syn PCR product และ (B) GAPDH PCR product ตามลำดับ

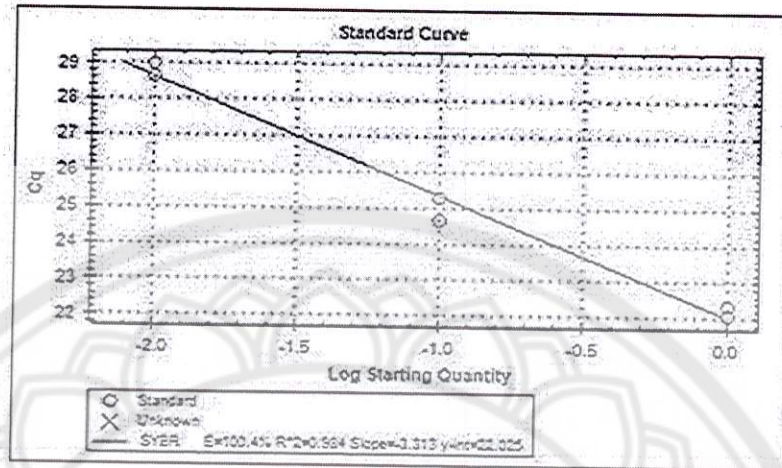
ค่า Efficiency correction (E) ต่อปฏิกิริยา qPCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่

ค่า Efficiency correction (E) ต่อปฏิกิริยา qPCR บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างสาย PCR product เพิ่มขึ้นแบบ 2^n (n คือจำนวนรอบ) ซึ่งค่า E ที่ยอมรับได้อยู่ในระหว่าง 90 – 110% ค่า E หาได้จากการทำ standard curve จากการเจือจางของตัวอย่าง cDNA แบบ ten-fold dilution ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 1, 1:10 และ 1:100 จากนั้นนำค่าเฉลี่ยของ Cq มาสร้างกราฟเพื่อหาค่า E จากสมการ $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100\%$ โดยใช้โปรแกรม CFX Manager ช่วยในการสร้างกราฟและคำนวณค่า E ของปฏิกิริยา ค่า R^2 และค่าความชันของ slope

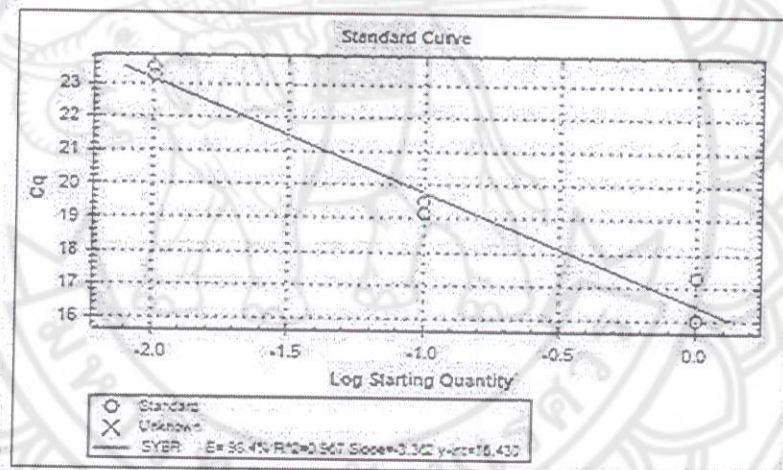
จากผลการทดลองพบว่าค่า E ของการเพิ่ม PCR product ของ α -syn มีค่าเท่ากับ 100.4%, R^2 เท่ากับ 0.984 และ slope เท่ากับ 3.313 ส่วนค่า E ของการเพิ่ม PCR product ของ GAPDH มีค่าเท่ากับ 98.4%, R^2 เท่ากับ 0.967 และ slope เท่ากับ 3.362 จากผลที่ได้ ค่า E ของไพรเมอร์แต่ละคู่ให้ช่วงที่สามารถยอมรับได้ ดังภาพ



(A)



(B)

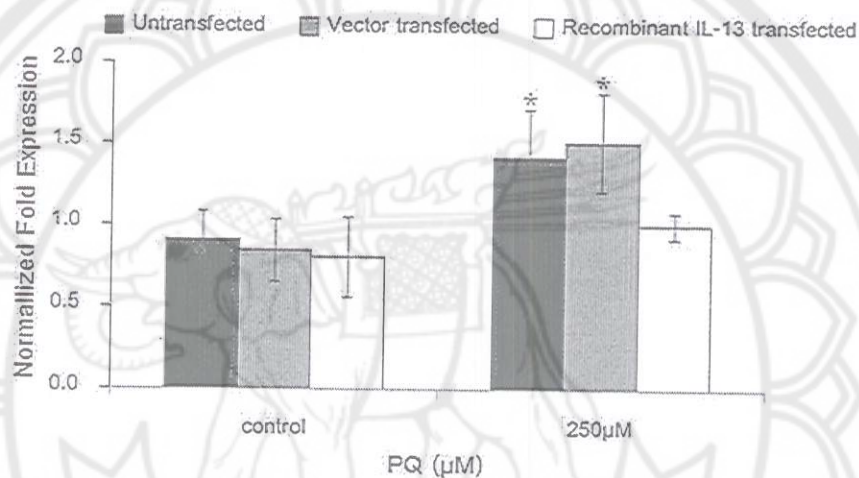


ภาพ 30 แสดง Standard Curve ค่า Efficiency correction หรือ E ของปฏิกิริยา qPCR โดยที่ (A) เป็นของ α -syn และ (B) เป็นของ GAPDH

ผลศึกษาการแสดงออกของยีน α -syn ในเซลล์ SK-N-SH ต่อการได้รับสาร paraquat จากปฏิกิริยา qPCR

จากการทำ qPCR เพื่อศึกษาตรวจสอบการแสดงออกของยีน α -syn ในเซลล์ SK-N-SH ต่อการได้รับสาร paraquat 250 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่ม control โดยการวัดสัญญาณ fluorescence ของ SYBR green ที่จับกับ PCR product ในปฏิกิริยา qPCR วิเคราะห์ค่า Cq ในช่วง threshold โดยใช้โปรแกรม CFX Manager ทำการ normalized expression

($\Delta\Delta Cq$) ออกมาในรูปแบบ expressionratio โดยมียีน GAPDH ถูกใช้เป็น reference gene เมื่อนำค่า expressionratio มาสร้างกราฟพบว่า กลุ่มที่ได้รับสาร paraquat ของตัวอย่างเซลล์ SK-N-SH ในส่วนของ Untransfected และ Vector transfected มีการแสดงของยีน α -syn สูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ในส่วนของเซลล์ SK-N-SH ที่มี Recombinant IL-13 transfected พบว่ามีการแสดงออกของยีน α -syn ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังภาพ



ภาพ 31 แสดงกราฟ Normalized Fold Expression ของยีน α -syn ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี พลาสมิດpSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มีพลาสมิດpSELECT-blasti-mcs-IL-13 (Recombinant IL-13) ต่อการได้รับสาร paraquat 250 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ: *คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เทียบกับกลุ่ม control (mean \pm SD) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($*P \leq 0.05$) เทียบกับกลุ่ม control