บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซลล์เพาะเลี้ยง

การศึกษานี้ทำการศึกษาใน เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 2 ชนิด คือ UM-UC-3 (ATCC No. CRL-1749) และ TCCSUP (ATCC No. HTB-5) และเซลล์เยื่อบุท่อไตปกติ คือ HK-2 (ATCC No. CRL-2190) เซลล์ทั้ง 3 ชนิดซื้อจาก The American Type Culture Collection (ATCC)

สถานที่ทำวิจัย

ห้อง 806 อาคารแพทยพัฒน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ และ ห้อง 1210 อาคารมหามกุฎ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2071921265

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ

ตาราง 1 เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave	Hirayama, Saitama, Japan
Autopipette 10, 100, 200, 1000 µL	Biorad, California, USA
C18 HPLC column	Vertical chromatography, Nonthaburi, Thailand
Cell culture flasks 75 cm^2	Corning, New York, USA
Cell culture plates: 6-,24-,96-well	Corning, New York, USA
Class II biohazard safety cabinet	Esco Technologies, Pensylvania, USA
CO_2 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Ohio, USA
Cryotube	SPL lifescience, Gyeonggi-do, South Korea
Cuvettes (Plastic and Quartz)	Perkin Elmer, USA
Distilled water maker	Thermo Scientific, Ohio, USA
Freezer (-20 °C)	Sanyo Electric, Osaka, Japan
Freezer (-80 °C)	Sanyo Electric, Osaka, Japan
Horizontal electrophoresis system	Bio-rad, California, USA
Microcentrifuge tubes	Axygen, California, USA
Microplate reader	Tecan, Mannedorf, Switzerland

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต
Nanodrop (Spectrophotometer)	Thermo Scientific, Ohio, USA
Nylon membrane filter 47 mm. 0.45 µm	Vertical chromatography, Nonthaburi, Thailand
PCR machine (Thermo-cycle)	ABI, Eppendorf, Hamburg, Germany
PCR machine (Thermo-cycle)	Bio-rad, California, USA
pH meter	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
PTFE membrane filter 47 mm. 0.45 µm	Vertical chromatography, Nonthaburi, Thailand
Refrigerated high speed centrifuge	Hettich, Tuttlingen, Germany
Sonicator	Sonics, Newtown, USA
Spectrophotometer	Thermo Scientific, Ohio, USA
Sterile pipette 10 mL	Coming, New York, USA
Storm™ fluorescence and phosphoimager	GE Healthcare, Slough, UK
Syringe filter nylon 13 mm. 0.22 µm.	Ageia Technologies, USA
Votex mixer	VORTEX-2 GENIE, USA
Water 600 controller	Waters Corporation, Milford, USA
Water 600 pump	Waters Corporation, Milford, USA
Water 717 plus autosampler	Waters Corporation, Milford, USA
Water 996 photodiode array detector	Waters Corporation, Milford, USA
Water bath	GFL, Burgwedel, Germany

2071921265

ตาราง 2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH)	Merck Millipore, Messachusetts, USA
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
25 bp DNA ladder	Invitrogen, California, USA
40% Acrylamide:Bisacrylamide (19:1)	Bio-rad laboratory, California, USA
Ammonium persulfate	Bio-rad laboratory, California, USA
Boric acid	Sigma, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue (CBB)	Bio-rad laboratory, California, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Disodium Ethylenediamine tetraacetic acid (Na_2•EDTA)	OmniPur, New Jersey, USA
EZ DNA Methylation gold kit	Zymo research, California, USA
Ethyl acetate	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, California, USA
Genomic DNA extraction kit	RBCBioscience, Taiwan
Glutathione Assay Kit	USBiological, Messachusetts, USA
Guanidine hydrochloride	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Hydrogenperoxide (H_2O_2)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Methionine	Merck Millipore, Messachusetts, USA
NEB3 buffer	New England Biolabs, Massachusetts, USA
Octanesulfonic acid	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Penicillin Streptomycin	Gibco, California, USA
Perchloric acid	Merck Millipore, USA
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Merck Millipore, Messachusetts, USA
Potassium Hydroxide	Merck Millipore, Messachusetts, USA
S-adenosylhomocysteine	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
S-adenosylmethionine (p-toluenesulfonate)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Sodium dihydrogen monophosphate (NaH_2PO_4)	Merck Millipore, Messachusetts, USA
Sodium disulfite	Merck Millipore, Messachusetts, USA
SyBr green	Invitrogen, California, USA
Taq DNA polymerase	Qiagen, Hilden, Germany
Taq I	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Tas I	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio-rad laboratory, California, USA
Tocopheryl acetate	Mega Lifescience, Bangkok, Thailand
Trichloroacetic acid	Merck Millipore, Messachusetts, USA
Tris base	Calbiochem, Merck Millipore, USA
Tryphan blue	Gibco, California, USA
Trypsin with EDTA	Gibco, California, USA

20719211265

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

การศึกษานี้ใช้ Human kidney cell line คือ HK-2 cell และ Human bladder cancer cell line ได้แก่ UM-UC-3 และ TCCSUP โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HK-2 cell ใน Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) สำหรับ UM-UC-3 และ TCCSUP เพาะเลี้ยงใน Eagle's minimal essential medium (EMEM) ที่มีส่วนผสมของ 10% Bovine serum albumin (BSA) และ 1% Penicillin Streptomycin (Pen-Strep) ภายใต้ภาวะที่ 37 °C, 5% CO_2 และ 95% humidity เมื่อเซลล์เจริญโดยมีปริมาณเซลล์ประมาณ 80-90% confluence ให้นำไปทดสอบต่างๆ หรือทำการ subculture เพื่อเพาะเลี้ยงต่อไป

กระบวนการ trypsinization ทำตามขั้นตอนต่อไปนี้ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่คงเหลือออกด้วย 10 mM Phosphate Buffer Saline (PBS) เติม 0.25% Trypsin/EDTA (1ml/25cm^2 of surface area) เอียงภาชนะเพาะเลี้ยง เพื่อให้ trypsin กระจายเต็มพื้นที่ภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C, 5% CO_2 และ 95% humidity นาน 3-5 นาทีหรือจนกว่าเซลล์จะหลุดออกจากภาชนะ (ไม่ควรเกิน 7 นาที) ตรวจสอบว่าเซลล์หลุดจากภาชนะเพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (inverted microscope) เติม complete medium 2 vol ของ trypsin/EDTA เพื่อหยุดปฏิกิริยานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วที่ความเร็ว 300 x*g* นาน 5 นาที แล้ว Resuspend เซลล์ ด้วย complete medium แล้วแบ่งลงภาชนะเพาะเลี้ยงตามจำนวนที่ต้องการ สำหรับการเก็บเซลล์แช่แข็ง ให้ resuspend ด้วย FBS with 10% DMSO

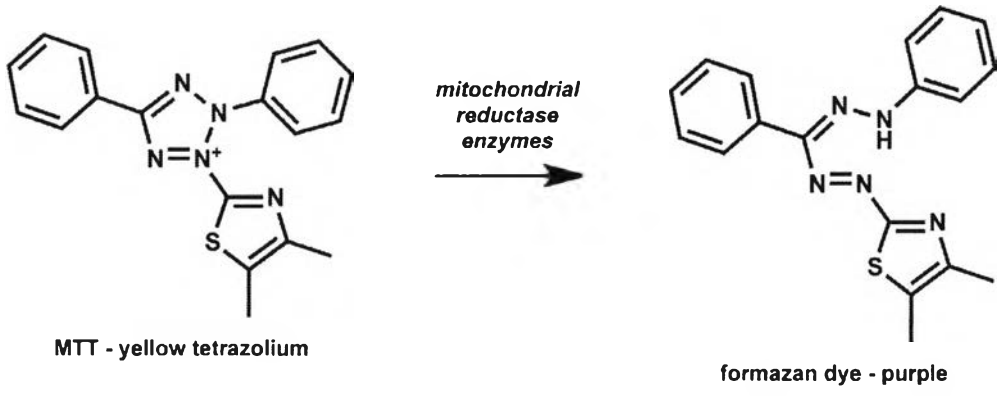
2. การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT reduction test

เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารอื่นๆที่นำมาบ่มกับเซลล์เพาะเลี้ยง โดยไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์

หลักการ

MTT assay เป็นการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ อาศัยการทำงานของ oxidoreductase enzymes ในการสลาย yellow-colored tetrazolium salt; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ให้กลายเป็น purple colored formazan crystal โดยเฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ที่จะมี enzymes activity สำหรับเปลี่ยนสีของ MTT ดังกล่าว ดังนั้น สีม่วงของ formazan ที่เกิดขึ้น เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณการมีชีวิตของเซลล์ (47)

2071921265



ภาพที่ 10 แสดงหลักการ MTT reduction test (47)

เพาะเลี้ยงเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) โดยให้มีจำนวนเซลล์ 5×10^3 เซลล์ บ่มที่ภายใต้ภาวะที่ 37°C, 5% CO_2 และ 95% humidity นาน 24 ชั่วโมง เตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน serum free media ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วเติม serum free media ที่มีสารทดสอบตามความเข้มข้นที่ต้องการ เมื่อครบเวลาให้ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 0.5 mg/mL MTT บ่มที่ภายใต้ภาวะที่ 37°C, 5% CO_2 และ 95% humidity นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติม DMSO เพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm (A) แล้วคำนวณ %Cell viability ดังนี้

$$\%Cell\ viability = \frac{A_{test}\ x\ 100}{A_{control}}$$

3. การสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยง (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เพื่อวัดระดับและรูปแบบการเกิด LINE-1 hypomethylation โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA extraction kit (RBCBioscience, Taiwan) ตามคำแนะนำเอกสารประกอบชุดน้ำยา มีวิธีการพอสังเขปดังนี้ ย้าย Trypsinized cell ลง 1.5 mL microcentrifuge tube แล้วนำปั่นที่ความเร็ว 2,000 rpm นาน 5 นาที ทิ้งส่วน supernatant แล้วละลายตะกอนด้วย 150 µL RBC lysis buffer เติม GB buffer 200 µL นำไป vortex แล้ว 70 °C นาน 10 นาที เติม absolute ethanol 200 µL แล้วผสมอย่างดี ประกอบ column ประกอบเข้ากับ collection tube แล้วดูดตัวอย่างทั้งหมดย้ายลง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 2 นาที ทิ้ง flow-through แล้วต่อ column เข้ากับ collection tube เติม W1 water 400 µL ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที ทิ้ง flow-through แล้วต่อ column เข้ากับ collection tube เติม Wash buffer 600 µL ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที ทิ้ง flow-through แล้วต่อ column เข้ากับ collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 3 นาที เพื่อกำจัด buffer ออกให้หมด ประกอบ column เข้ากับ 1.5 mL microcentrifuge tube เติม elution buffer 100 µL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที

2071921265

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo-Scientific) แล้วเก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20 °C

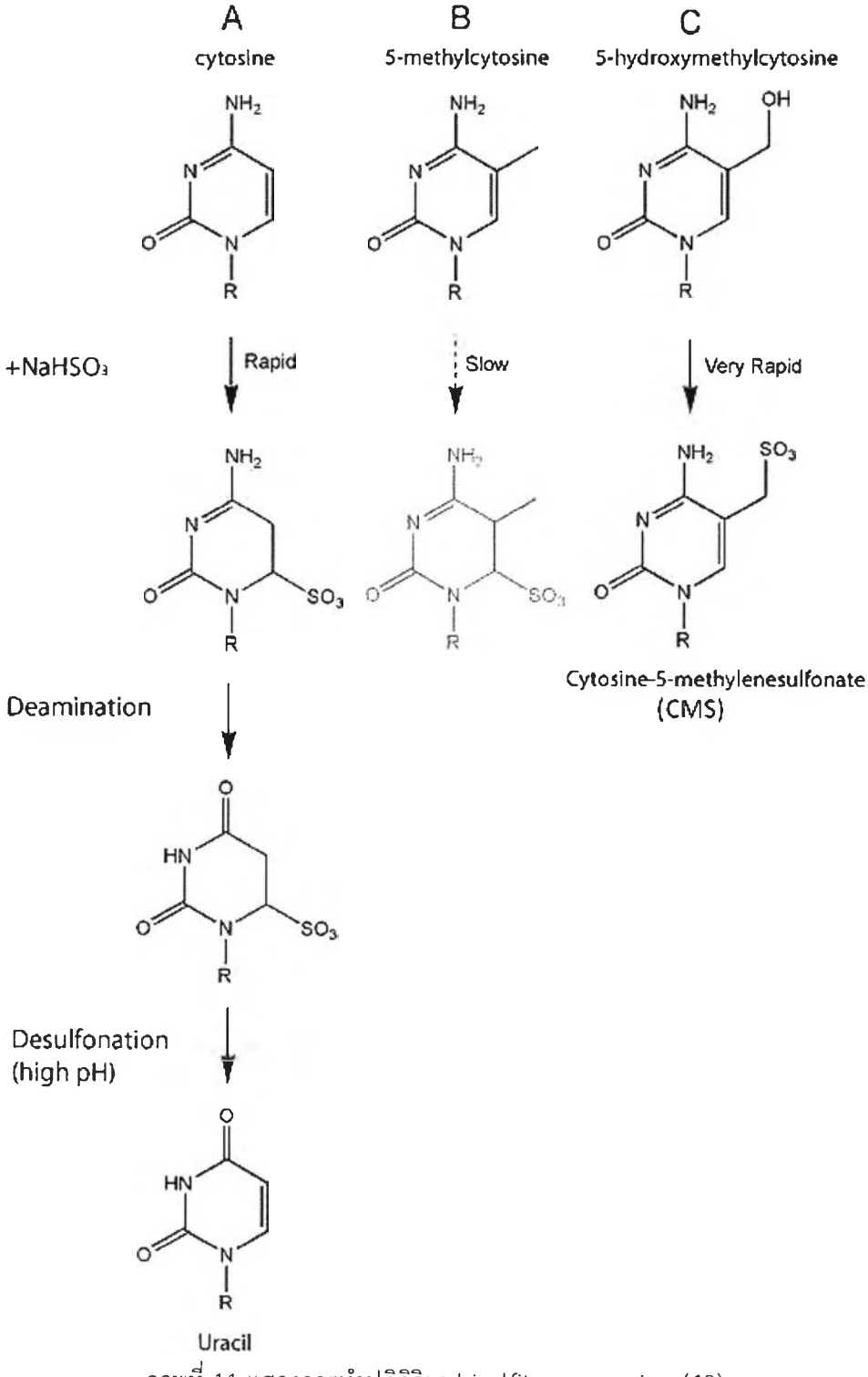
4. การวัดระดับการเกิด methylation ของ LINE-1 โดยวิธี combined bisulfite restriction analysis (COBRA LINE-1) (48)

หลักการ

เมื่อนำ genomic DNA มาทำปฏิกิริยากับ bisulfite (HSO_3^-) จะเกิดปฏิกิริยา deamination โดยดึงหมู่ amino (NH_2-) ออกจาก unmethylated cytosine แต่จะไม่มีผลต่อ 5-methylcytosine (ภาพที่ 11) ทำให้ unmethylated cytosine ที่ถูกดึงหมู่ amino ออก ถูกเปลี่ยนเป็น uracil เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จะเปลี่ยนเป็น thymine จากปฏิกิริยา bisulfite conversion จะทำให้เกิดการสูญเสียหรือคงไว้ของตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (PCR product) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะส่งผลให้เกิดการตัดที่แตกต่างกันระหว่าง unmethylated cytosine และ methylated cytosine ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์จากการย่อย (digested product) ที่มีขนาดแตกต่างกัน

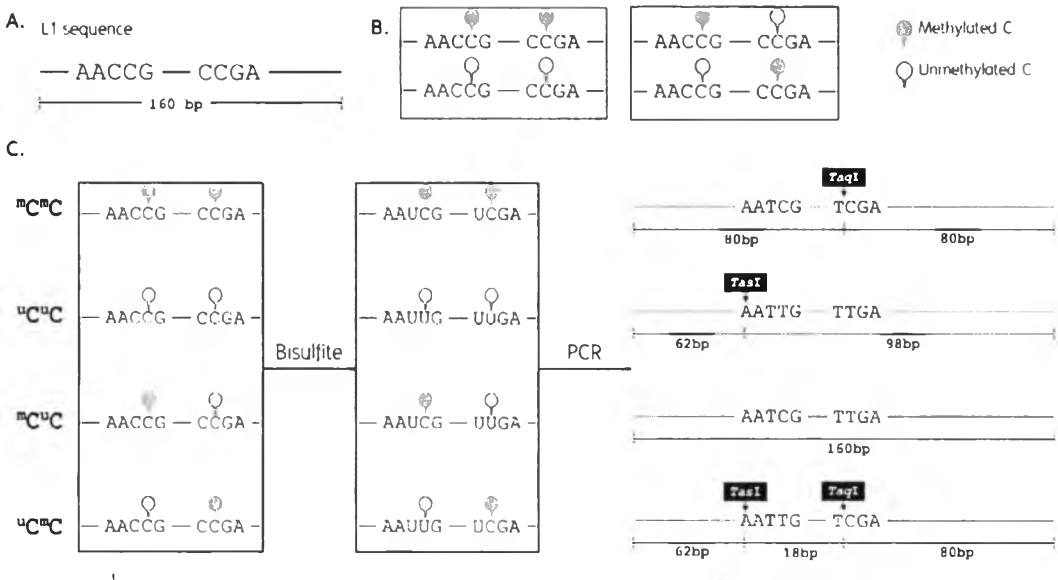
สำหรับวิธี COBRA LINE-1 เป็นการวัด methylation ที่ CpG dinucleotides 2 ตำแหน่ง บริเวณ 5'-UTR ของ LINE-1 คือ 5'-AAC$\underline{C_1G}$------C$\underline{C_2G}$A-3' ซึ่งที่ตำแหน่งดังกล่าว สามารถเกิด methylation ได้ 4 รูปแบบ คือ เกิด methylation ที่ CpG dinucleotides ทั้งสองตำแหน่ง (complete methylation, $^mC_1{}^mC_2$) และ เกิด unmethylation ที่ CpG dinucleotides ทั้งสองตำแหน่ง (complete unmethylation, $^uC_1{}^uC_2$) หรือ เกิด methylation ที่ CpG dinucleotides ตำแหน่งใดหนึ่งตำแหน่ง (partial methylation, $^mC_1{}^uC_2$ และ $^uC_1{}^mC_2$) ซึ่งเมื่อนำดีเอ็นเอที่ทำปฏิกิริยากับ bisulfite แล้วนำมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถตัดด้วย restriction enzyme ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ *Taq*I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำที่ T^CGA และ *Tas*I มีตำแหน่งจดจำที่ ^AATT โดย methylated C$\underline{^mC_2}$GA ถูกเปลี่ยนเป็น TCGA ซึ่งจะถูกตัดโดย *Taq*I และ unmethylated AAC$\underline{^uC_1}$G จะถูกเปลี่ยนเป็น AATTG ซึ่งจะถูกตัดโดย *Tas*I ทำให้ได้ digested product ที่แตกต่างกันตามรูปแบบของการเกิด methylation ได้แก่ 1) Hypermethylated loci ; $^mC_1{}^mC_2$ มีขนาด 80 bp 2) Hypomethylated loci ; $^uC_1{}^uC_2$ มีขนาด 98 bp และ 3) Partial methylated loci :$^mC_1{}^uC_2$ มีขนาด 160 bp และ $^uC_1{}^mC_2$ มีขนาด 80, 62 และ 18 bp (ภาพที่ 12)

2071921265



ภาพที่ 11 แสดงการทำปฏิกิริยา bisulfite conversion (49)

2071921265



ภาพที่ 12 แสดงหลักการวัดระดับการเกิด DNA methylation ด้วยเทคนิค COBRA LINE-1

A. ตำแหน่งของ CpG dinucleotides บน LINE-1 sequence ขนาด 160 bp ที่ใช้ในการศึกษา global genome methylation B. รูปแบบการเกิด methylation ของ LINE-1 ที่มีโอกาสเกิดขึ้น 4 รูปแบบ ได้แก่ 1) $^{m}C_1{}^{m}C_2$ 2) $^{u}C_1{}^{u}C_2$ 3) $^{m}C_1{}^{u}C_2$ และ 4) $^{u}C_1{}^{m}C_2$ เมื่อทำปฏิกิริยา bisulfite conversion จะทำให้ unmethylated C (^{u}C) เปลี่ยนเป็น uracil ในขณะที่ methylated C (^{m}C) ยังคงเป็น C เหมือนเดิม ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR (U เปลี่ยนเป็น T) ทำให้ได้ product ที่เปลี่ยนตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ สุดท้ายนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*TaqI* และ *TasI*) ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ของแต่ละรูปแบบที่มีขนาดแตกต่างกัน ตามตัวเลขที่แสดงในภาพ

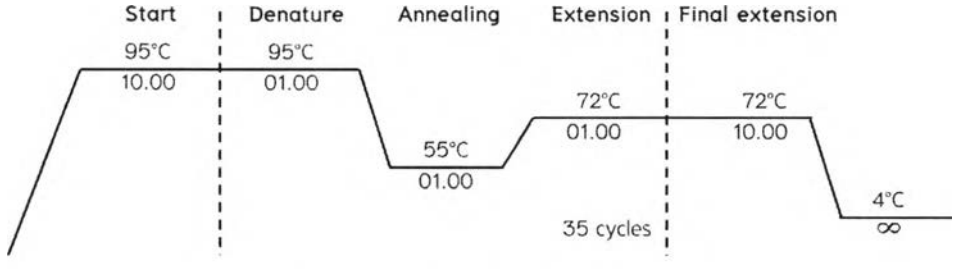
วิธีการทดสอบ

นำดีเอ็นเอปริมาณ 250 ng มาทำปฏิกิริยา bisulfite conversion ด้วยชุดน้ำยา ชุด EZ DNA Methylation-GoldTM Kit (ZYMO RESEARCH, USA) ตามเอกสารประกอบน้ำยาโดยมีวิธีการทำปฏิกิริยา Bisulfite conversion ดังนี้ ผสม 50 ng/µL DNA ปริมาตร 20 µL กับ CT Conversion reagent 130 µL ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปต นำหลอดตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 98°C นาน 10 นาที 64°C นาน 2.5 ชั่วโมง ตามลำดับ (หลังจากนั้นสามารถเก็บที่ 4 °C นาน 20 ชั่วโมง) เติม M-binding buffer 600 µL ใน Zumo-Spin IC column แล้วประกอบเข้ากับ collection tube นำตัวอย่าง DNA ย้ายลง Zumo-Spin IC column ที่มี M-binding buffer 600 µL ผสมให้เข้ากันด้วยวิธี inverting ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที ทิ้งสารละลายเติม M-Wash buffer 100 µL ลง column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที เติม M-Desulphonation buffer 200 µL ลง column บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาทีแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที เติม M-Wash buffer 200 µL ลง column ปั่นเหวี่ยงที่

2071921265

ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) เติม M-Elution buffer 20 µL ลง column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที เก็บ DNA ที่ -20 °C เพื่อทดสอบต่อไป

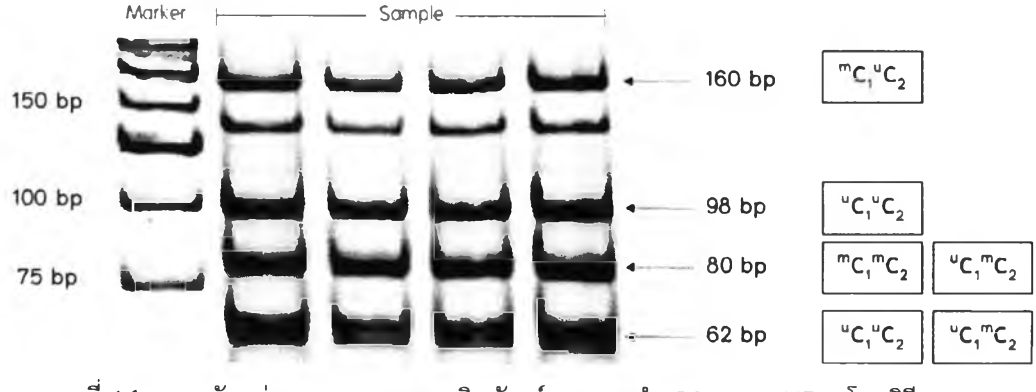
นำ bisulfite treated DNA มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ดังนี้ LINE-1-F: (5'-CCG-TAA-GGG-GTT-AGG-GAG-TTT-TT-3') และ LINE-1-R: (5'-RTA-AAA-CCC-TCC-RAA-CCA-AAT-ATA-AA-3') ภายใต้ภาวะในการทำปฏิกิริยาคือ Denature ที่ 95 °C นาน 1 นาที Annealing ที่ 55 °C นาน 1 นาที Extension ที่ 72 °C นาน 1 นาที ทั้งหมด 35 รอบปฏิกิริยา (35 cycles) ดังแสดงในรูปที่ 13 จากปฏิกิริยานี้จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 160 bp จากนั้น นำ PCR product ที่ได้ มาย่อยโดย restriction enzyme *Taq*I (2 U) (sticky end) และ *Tas*I (2 U) (sticky end) ในสารละลาย NEB3 buffer (New England Biolabs, Ontario, Canada) ที่ 65°C ข้ามคืน



ภาพที่ 13 แสดงภาวะต่างๆสำหรับการทำ LINE-1 PCR

การตรวจสอบ PCR product ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

เตรียม 8% non-denaturing polyacrylamide gel (ภาคผนวก) แล้วเทใส่พิมพ์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 60 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา polymerization อย่างสมบูรณ์ จากนั้นผสม 6X loading dye และ PCR product ในอัตราส่วน Dye:Digested product = 1:6 ให้ DNA เคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า ความต่างศักย์ 130 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อม DNA ด้วย SyBr Green I โดยเจือจาง SyBr Green I ใน 1X TBE (1:10,000) ตรวจวัดระดับความเข้ม (intensity) ของ PCR products ด้วยเครื่อง Storm™ fluorescence and phosphoimager และ Image Quant software (Molecular Dynamics, GE Healthcare, Slough, UK) ที่ตำแหน่ง 160 bp ($^{m}C_1{}^{u}C_2$) 98 bp ($^{u}C_1{}^{u}C_2$) 80 bp ($^{m}C_1{}^{m}C_2$ หรือ $^{u}C_1{}^{m}C_2$) และ 62 bp ($^{u}C_1{}^{u}C_2$ หรือ $^{u}C_1{}^{m}C_2$) ดังตัวอย่างในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่างการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำ COBRA-LINE-1 โดยวิธี PAGE

20711921265

การคำนวณระดับการเกิด methylation

ให้นำความเข้มของ band (%band) มาหารด้วยจำนวนเบส ให้ได้ความเข้มของ band ต่อเบส เพื่อเป็นการ normalization ให้สามารถเปรียบเทียบความเข้มของ band ที่มีขนาดต่างกันได้ โดยการคำนวณเป็นดังต่อไปนี้

%band 160 bp หารด้วย 160 = A

%band 98 bp หารด้วย 94 = B

%band 80 bp หารด้วย 78 = C

%band 62 bp หารด้วย 62 = D

%methylation (%^{m}C) = $(^{m}C_1+^{m}C_2)/(^{u}C_1+^{m}C_1+^{u}C_2+^{m}C_2)$

= $100\times(C+A)/(C+A+A+B+D)$

%hypermethylatied loci (%$^{m}C^{m}C$) = $^{m}C_1{}^{m}C_2/(^{m}C_1{}^{m}C_2+{}^{m}C_1{}^{u}C_2+{}^{u}C_1{}^{m}C_2+{}^{u}C_1{}^{u}C_2)$

= $100\times((C-D+B)/2)/(((C-D+B)/2)+A+D)$

%partial methylated loci (%$^{m}C^{u}C$) = $^{m}C_1{}^{u}C_2/(^{m}C_1{}^{m}C_2+{}^{m}C_1{}^{u}C_2+{}^{u}C_1{}^{m}C_2+{}^{u}C_1{}^{u}C_2)$

= $100\times A/(((C-D+B)/2)+A+D)$

%partial methylated loci (%$^{u}C^{m}C$) = $^{u}C_1{}^{m}C_2/(^{m}C_1{}^{m}C_2+{}^{m}C_1{}^{u}C_2+{}^{u}C_1{}^{m}C_2+{}^{u}C_1{}^{u}C_2)$

= $100\times(B-D)/(((C-D+B)/2)+A+D)$

%hypomethylated loci (%$^{u}C^{u}C$) = $^{u}C_1{}^{u}C_2/(^{m}C_1{}^{m}C_2+{}^{m}C_1{}^{u}C_2+{}^{u}C_1{}^{m}C_2+{}^{u}C_1{}^{u}C_2)$

= $100\times B/(((C-B+D)/2)+A+D)$

2071921265

5. การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี freeze-thawing

หลังจากการเลี้ยงเซลล์ในภาวะต่างๆ ใน 6-well plate ครบกำหนดเวลาแล้ว ทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วล้างด้วย 10 mM PBS จากนั้นเติม PBS ปริมาตร 1 mL ทำการขูดเซลล์ด้วย cell scraper ย้ายเซลล์ที่ได้ลงสู่ 1.5 mL microcentrifuge tube นำไปแช่แข็งที่ตู้เย็น -70 °C นาน 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายโดยการผ่านน้ำประปา เมื่อเซลล์ละลายหมดแล้วให้นำไป sonicate (amplitude 2%) นาน 1 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที เก็บส่วน supernatant สำหรับการทดสอบอื่นๆ ต่อไป

6. การวัดระดับโปรตีนด้วยวิธี Dye binding (Bradford assay) (50)

อาศัยหลักการ Spectrophotometric colorimetric protein assay (Bio-rad, California, USA) โดยโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับสี Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 ในภาวะที่เป็นกรด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีของ CBB ซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm.

วิธีการ

เตรียม Working Coomassie Brilliant Blue reagent (ภาคผนวก) แล่วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง นำตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 25 µL ผสมกับ working CBB 1.25 mL ผสม

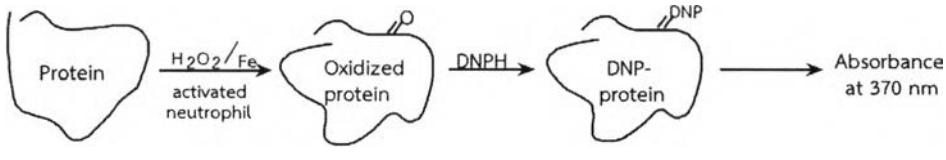
ให้เข้ากันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm (A) คำนวณความเข้มข้น (C) ของโปรตีนเปรียบเทียบกับ BSA Standard ดังนี้

$$Protein\ (mg/mL) = \frac{A_{test}}{A_{standard}} x\ C_{standard}$$

7. การวัดระดับ protein carbonyl ด้วยวิธี Spectrophotometric DNPH assay

หลักการ

โปรตีนคาร์บอนิลเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น การวัดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลอาศัยการทำปฏิกิริยาของ protein carbonyl กับ 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) เกิดเป็น 2,4-dinitrophenyl (DNP) hydrazone ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm. (51, 52)



ภาพที่ 15 แสดงหลักการการวัดโปรตีนคาร์บอนิลด้วยวิธี DNPH assay

วิธีการ

นำโปรตีนที่สกัดได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 62.5 µL ส่วนแรกคือ Blank ให้เติมด้วย 250 µL ของ 2 M HCl ส่วนที่สองคือ Test ให้เติมด้วย 250 µL ของ 10 mM DNPH นำทั้งหมดไปบ่มที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง โดยให้เขย่าอย่างสม่ำเสมอทุกๆ 10 นาที เมื่อครบเวลาให้เติม 20% Trichloroacetic acid ปริมาตร 300 µL จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งนาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ทิ้งส่วน supernatant ปั่นล้างตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ด้วย ethanol:ethylacetate (1:1) ปริมาตร 625 µL จำนวน 3 ครั้ง นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายด้วย 6 M guanidine hydrochloride ปริมาตร 300 µL นำไป sonicate ที่ amplitude 20% นาน 5 นาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 nm. แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำมาคำนวณปริมาณโปรตีนคาร์บอนิล ดังนี้

$$Protein\ carbonyl\ (nmol\ /\ mg\ of protein) = \frac{A_{375}\ x\ 45.45}{mg\ of\ protein}$$

2071921285

8. การวัดปริมาณ glutathione ด้วยชุดน้ำยา Glutathione (USBiological, USA)

หลักการ

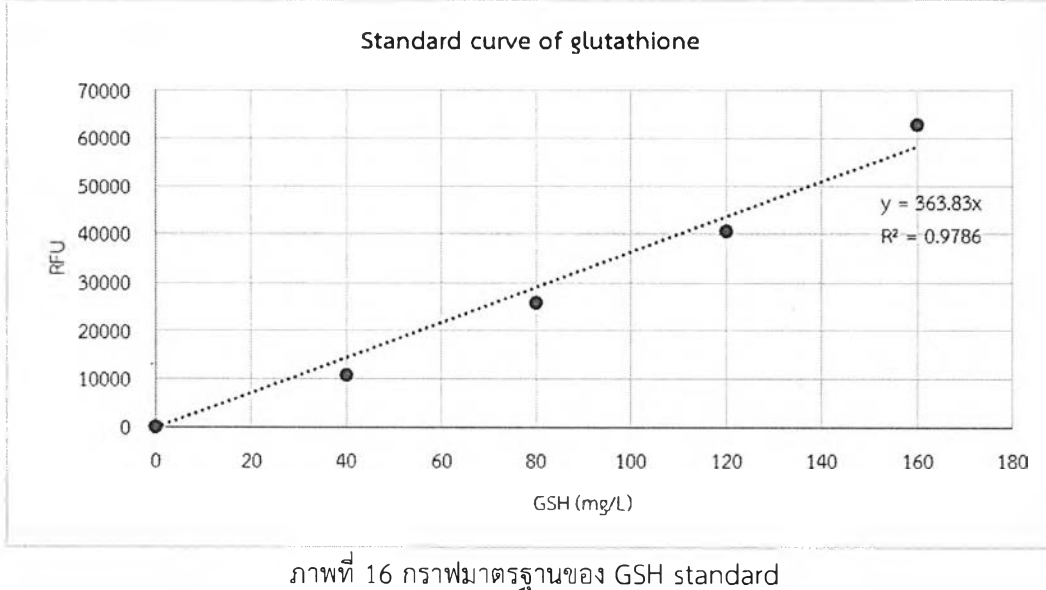
การวิเคราะห์กลูตาไทโอนเชิงปริมาณ (quantification of glutathione) อาศัยการทำงานของ *o*-phthalaldehyde (OPA) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ GSH (แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ GSSG) แล้วเกิดการเปล่งแสง fluorescence ให้ให้สามารถวัดปริมาณ GSH ได้อย่างจำเพาะ สำหรับการวัดปริมาณ Total glutathione อาศัยการทำปฏิกิริยาของ reducing agent ในการเปลี่ยน GSSG เป็น GSH ซึ่งจะสามารถทำปฏิกิริยากับ OPA probe แล้ววัดปริมาณได้ สำหรับการวัดปริมาณ GSSG โดยตรงอาศัยการทำงานของ GSH quencher ในการกำจัด GSH ก่อนการเติม reducing agent ซึ่งจะทำให้สามารถวัดปริมาณ GSSG ได้โดยตรง

การเก็บตัวอย่าง

ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 µL Ice cold Glutathione assay buffer ไปเปตตัวอย่าง 60 µL ลงใน pre-chilled PCA แล้ว vortex เพื่อทำให้เซลล์แตกและตกตะกอนโปรตีน ตั้งในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยแรง 13,000 xg ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 นาที แล้วเก็บส่วน supernatant นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 °C

การสร้างกราฟมาตรฐาน

เติม 0.2 µg/µL working GSH standard solution ลงใน 96-well plate ปริมาตร 0, 2, 4, 6, 8, 10 µL สำหรับความเข้มข้น 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 µg/well GSH ปรับปริมาตรให้เป็น 90 µL (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานของ GSH standard

การเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบ

เติม 20 µL Ice cold 3 M KOH ผสมกับ PCA preserved sample เพื่อตกตะกอน PCA และ neutralize sample ตั้งในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยแรง 13,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 นาที แล้วเก็บส่วน supernatant ย้าย 10 µL sample ลง 96-well plate

ขั้นตอนการวิเคราะห์

- สำหรับการวิเคราะห์ GSH : ปรับปริมาตรตัวอย่างให้เป็น 90 µL
- สำหรับการวิเคราะห์ Total glutathione : ปรับปริมาตรตัวอย่างให้เป็น 80 µL เติม 10 µL Reducing reagent ผสมให้เข้ากันดีแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยน GSSG มาเป็น GSH
- สำหรับการวิเคราะห์ GSSG : ปรับปริมาตรตัวอย่างให้เป็น 70 µL เติม 10 µL GSH quencher ผสมให้เข้ากันดีแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 10 µL reducing reagent เพื่อทำลาย GSH quencher และเปลี่ยน GSSH เป็น GSH
- จากนั้นเติม 10 µL OPA probe ลงในแต่ละหลุม ทั้งในหลุมสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันดี และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 40 นาที อ่านค่าแสงฟลูออเรสเซ้นส์ด้วยเครื่อง microplate reader โดยกำหนด excitation ที่ 340 นาโนเมตร และ emission ที่ 420 นาโนเมตร

$$Glutathione = \frac{Glutathione\ amount\ from\ standard\ curve\ (\mu g)}{Sample\ volume\ added\ to\ the\ wells\ (mL)}$$

9. การวิเคราะห์การสร้าง ROS ภายในเซลล์ด้วยวิธี DCFH-DA

การวิเคราะห์การสร้าง ROS ในเซลล์โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,7-dichloro-dihydrofluorescin diacetate (DCFH-DA) โดย ROS ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์จะทำปฏิกิริยากับ DCFH-DA แล้วถูกเปลี่ยนเป็น dichloro-dihydrofluorescin (DCF) ซึ่งจะเรืองแสง fluorescence โดยปริมาณการเรืองแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ ROS ในเซลล์ ขั้นตอนการวิเคราะห์พอสังเขป คือ เพาะเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plate) แต่ละหลุมเริ่มต้นที่ 10^5 เซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม (90% confluence) จากนั้นเติมสารละลาย working 0.5 mM DCFH-DA (ภาคผนวก) ที่ละลายด้วย serum-free media หลุมละ 100 µL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 30 นาที เตรียม 20 µL H_2O_2 ใน serum-free media แล้วเติมลงในแต่ละหลุม (หลุมละ 100 µL) จากนั้นนำไปวัด fluorescent intensity ที่เวลา 0 นาที และ 60 นาที โดยกำหนด excitation ที่ 480 นาโนเมตร และ emission ที่ 535 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU) ดังนี้

$$DCF\ fluorescence\ (AFU) = \frac{Fluorescence\ intensity_{T_{60}}}{Fluorescence\ intensity_{T_0}}$$

2071921265

10. การวิเคราะห์ปริมาณ SAM, SAH โดยเทคนิค HPLC (53, 54)

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียม cell lysate โดยวิธี freeze-thawing แล้วนำไป sonicate เพื่อให้เซลล์แตก นำ cell lysate ที่ได้มาตกตะกอน ด้วยการเติม 1 vol ของ 0.8 M perchloric acid containing 3.2 mM sodium disulfite เพื่อตกตะกอนโปรตีน บ่มในอ่างน้ำแข็ง นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 x*g* ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 4 N KOH บ่มใน ice bath นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 x*g* ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอน เก็บส่วนของ supernatant แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 μm เก็บ filtrated supernatant ที่ -20 °C จนกว่าจะทำการแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ SAM และ SAH ด้วยเทคนิค HPLC-UV

แยก SAM และ SAH ด้วยเทคนิค C18 HPLC column ใช้Isocratic mobile phase ประกอบด้วย Solvent A (Methanol) และ Solvent B (4.5 mM Octanesulfonic acid และ 50 mM phosphate buffer solution pH 3.5) ในสัดส่วน 30:70 ใช้ flow rate ของ mobile phase คือ 1.0 mL/min (turnover time per sample เท่ากับ 15 นาที) แล้วตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 nm. (ภาพที่ 17) ความเข้มข้นของ SAM และ SAH คำนวณจากพื้นที่ใต้พีค (peak under area) เปรียบเทียบกับ SAM และ SAH standard (ละลายด้วย 0.4 M Perchloric acid)

2071921265

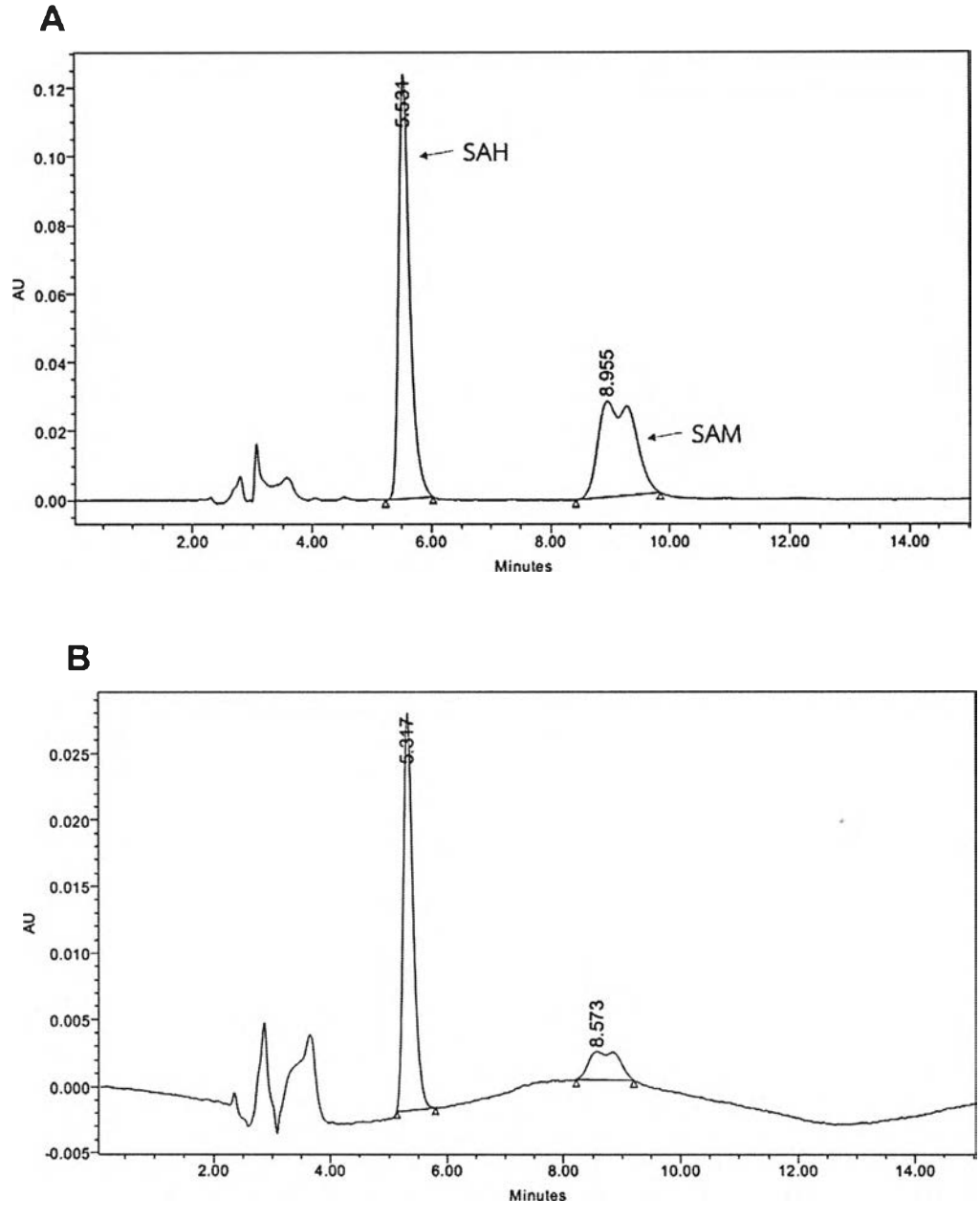
การเก็บข้อมูล

ทำการบันทึกข้อมูลการทดลองโดยทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวน ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เก็บรวบรวม ณ ห้อง 806 อาคารแพทยพัฒน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูล

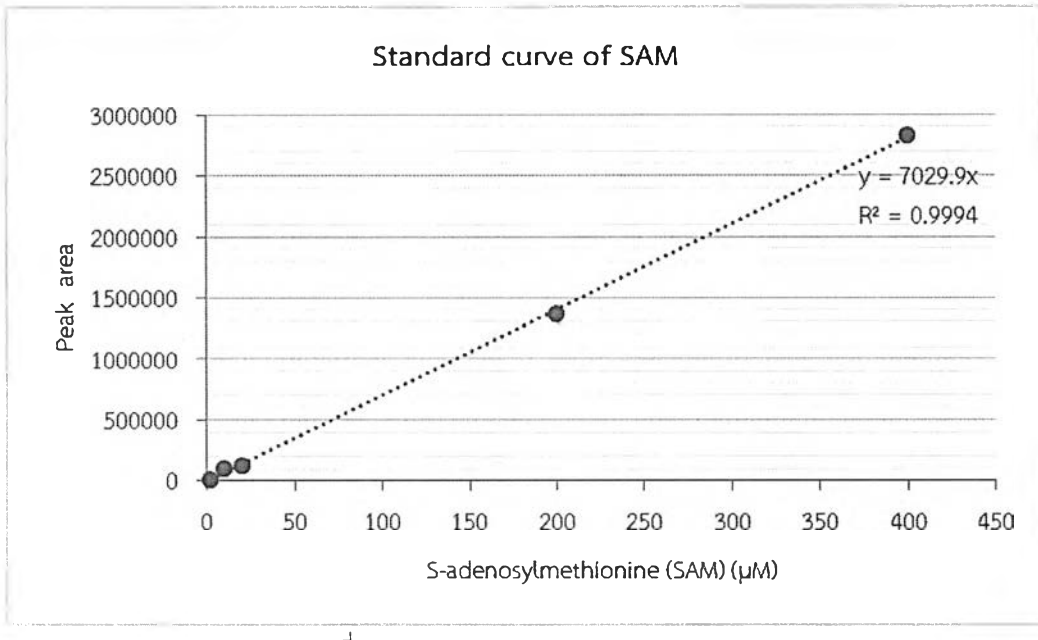
สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) วิเคราะห์ข้อมูลและนำเสนอโดยแสดงค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD)

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดย unpaired-sample t-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ 2 กลุ่มขึ้นไป ที่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้ ANOVA test ตามด้วย Sidak multiple comparison test

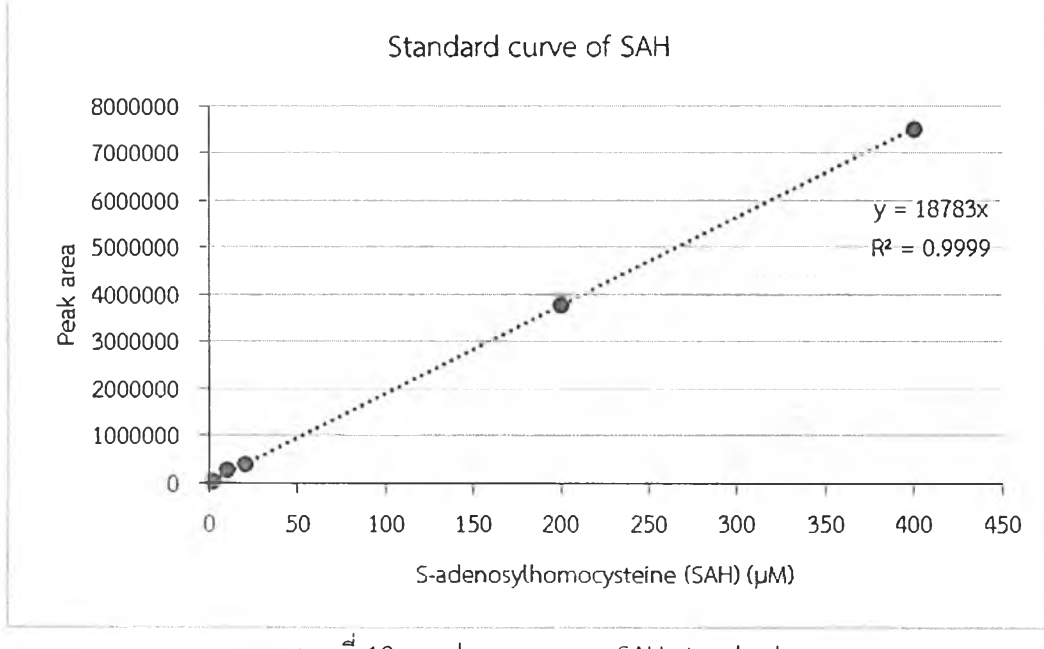


ภาพที่ 17 ตัวอย่าง chromatogram ของ SAM และ SAH standard (A) และสารตัวอย่าง cell lysate (B)

2071921265



ภาพที่ 18 กราฟมาตรฐานของ SAM standard



ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐานของ SAH standard

20711921265

I 3744 91894