บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีทดลอง

3.1 วัสดุสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

3.1.1 เซลล์เพาะเลี้ยง

- เซลล์มะเร็งที่มีต้นกำเนิดจากไตของตัวอ่อนของมนุษย์ (Human Embryonic Kidney cell : HEK293T) ได้รับจาก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1.2 อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

- อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (Hyclone, U.S.A)
- Fetal Bovine Serum ขนาด 100 mL (Starrate, Australia)

3.1.3 สารเคมีสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

- Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$, Merck, Germany)
- Penicillin-Streptomycin solution (Invitrogen, U.S.A.)

3.1.4 สารเคมีสำหรับใช้ในการเตรียมสารละลายพื้นฐานสำหรับใช้ในการทดลอง

- Ethanol (CH_3CH_2OH, Lab-Scan Ltd., Ireland)
- Dimethyl Sulfoxide (C_2H_6SO, Sigma Aldrich, U.S.A.)
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4, Merck, Germany)
- Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4, Fluka, Switzerland)
- Sodium chloride (NaCl, Merck, Germany)
- Potassium chloride (KCl, Merck, Germany)
- Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt ($CH_2.N(CH_2.COOH).CH_2COONa)_2.2H_2O$, BDH Chemicals, England)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลายพื้นฐาน และอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ กลุ่ม 3.2.1 ก.

- ขวดสำหรับปรับปริมาตรขนาด 1,000 และ 500 มิลลิลิตร (Volumetric Flask 1,000 and 500 mL; Pyrex, U.S.A.)
- บีกเกอร์ขนาด 1,000, 250, และ 50 มิลลิลิตร (Pyrex, U.S.A.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter; รุ่น pH 900, Precisa, Swisserland)

- กรวยแก้วสำหรับใช้กรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร พร้อมกับขาตั้ง

- กระดาษกรอง ("Whatman" เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 เซนติเมตร)

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Advanturer, Ohaus Corporation, U.S.A.)

- แผ่นเยื่อกรองขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร (Membrane Filter pore size 0.2 μm ∅ 47 mm; ยี่ห้อ Supor, Pall Corporation, U.S.A.)

- ขวดแก้วทนความร้อนสูงขนาด 1,000 และ 250 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)

- แถบวัดการกระจายความร้อนในการฆ่าเชื้อของหม้อนึ่งความดัน (Autoclave tape, K.S. Science group, Thailand)

- ถาดทดสอบสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี 24 หลุม (24-well Culture Plate; Corning Corporation, U.S.A.)

- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave; ยี่ห้อ MT-Sterilizers Automatic 100, Chiang Mai Medtech system, Thailand)

- ตู้แช่แข็ง (Freezer; Sharp, Japan) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ -20°C

- ตู้อบแห้ง (Thai Stanless Argon, Thailand) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50°C

กลุ่ม 3.2.1 ข.

- กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร (Cylinder 100 mL, Pyrex, U.S.A.)

- เครื่องปั๊มสุญญากาศ (รุ่น DOA-P5O4-BN, Gast Manufacturing, U.S.A.)

- ชุดกรองสารละลายแบบสุญญากาศ ประกอบด้วย ขวดรูปชมพู่ชนิด 2 ทางขนาด 1,000 มิลลิลิตร ฐานสำหรับวางแผ่นเยื่อกรอง และถ้วยโพลิโพรไพลีนสำหรับใส่สารละลายที่จะทำการกรอง

- อะลูมิเนียมฟอยล์ (Diamond, U.S.A.)

กลุ่ม 3.2.1 ค.

- หลอดเซนตริฟิวจ์โพลิโพรไพลีนขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tubes 15 and 50 mL; ยี่ห้อ Neptune, CLP, U.S.A.)

- ปั๊มสำหรับดูดสารละลายเข้าสู่ปิเปต (Pipette boil; High Tech Lab, Poland)

- ปิเปตขนาด 10 และ 5 มิลลิลิตร

- Blue tip ขนาด 1,000 ไมโครลิตร (Corning Corporation, U.S.A)

- Automatic pipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (ยี่ห้อ Labmate, High Tech Lab, Poland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่ม 3.2.1 ง.

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Model 84, Thelco, U.S.A.)

- ตู้กรองจุลชีพสำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือตู้ลามินาร์โฟล์ (Laminar Flow Hood; Dwyer Instruments. Inc., U.S.A.)

- ตู้เย็น (Refrigerator; Sharp, Japan) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ $4^{o}C$

- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope; Olympus, Japan)

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้อุปกรณ์ทั้งหมดในกลุ่ม 3.2.1 ค. และ 3.2.1 ง. และมีอุปกรณ์ที่ใช้เพิ่มเติม คือ

กลุ่ม 3.2.2 ก.

- Pasture pipette

- ลูกยางขนาดเล็กสำหรับใช้ดูดสารละลาย

กลุ่ม 3.2.2 ข.

- ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (25 cm^2-Tissue Culture Flask; Corning Corporation, U.S.A)

- ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon Dioxide Water-Jacketed Incubator; Nuair, U.S.A.)

- เครื่องปั่นเซนตริฟิวจ์ (ยี่ห้อ Kubota รุ่น 5200, Japan)

- หลอดไครโอขนาด 2 มิลลิลิตรทำด้วยโพลิโพรไพลีน (Cryotube 2 mL; Corning Corporation, U.S.A.) สำหรับเก็บรักษาเซลล์ในสภาพแช่แข็ง

- ตู้แช่แข็งสำหรับการเก็บรักษาเซลล์ (Freezer; PTW, Thailand) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ $-70^{o}C$

3.3 วัสดุอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบความเป็นพิษของซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดง

3.3.1 วัสดุสำหรับตรวจสอบความเป็นพิษของซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดง

กลุ่ม 3.3.1 ก.

- ตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *Monascus purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน (ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

- Standard Citrinin ขนาด 5 mg (สกัดจากเชื้อรา *Penicillium citrinum*, Sigma Aldrich, U.S.A.)

- Methanol HPLC grade (CH_3OH, Fisher Scientific, U.K.)

กลุ่ม 3.3.1 ข.

- Dimethyl Sulfoxide (C_2H_6SO, Sigma Aldrich, U.S.A.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- อาหารเลี้ยงเซลล์ Complete RPMI-1640

- เอทานอลเข้มข้น 70% (70% Ethanol)

- Trypan blue

- MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; $C_{18}H_{16}BrN_5$, USB Corporation, Austria)

3.3.2 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างข้าวแดง ใช้อุปกรณ์ทั้งหมดในกลุ่ม 3.2.1 ค. และ 3.2.2 ก. มีอุปกรณ์ที่ใช้เพิ่มเติม คือ

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AB 204, Switzerland)

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Advanturer, Ohaus Corporation, U.S.A.)

- เครื่องเขย่าชนิดปรับรอบการหมุนได้ (รุ่น SI-300, Jeio Tech, Korea)

- ขวดสำหรับปรับปริมาตรขนาด 50 และ 1,000 มิลลิลิตร (Volumetric flask 50 and 1,000 mL; Pyrex, U.S.A.)

- อะลูมิเนียมฟอยล์ (Diamond, U.S.A.)

- หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 20 x 100 มิลลิเมตร (Pyrex, U.S.A.)

- ไซริงจ์แก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (Syrynge 10 mL, ยี่ห้อ Micro-mate, Popper & Sons, Italy)

- ไซริงจ์พลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร (Syrynge 3 mL, ยี่ห้อ NIPRO, NIPRO (Thailand) Corp., Ltd., Thailand)

- ชุดกรองขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน (Syrynge filter pore size 0.45 μm, Whatman)

- ขวดก้นกลมสำหรับใช้ในการระเหยแห้งขนาด 1 ลิตร (Buchi, Switzerland)

- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotavapor; ยี่ห้อ Buchi รุ่น 461, Laboratoriums-technik AG, Switzerland)

- หลอดเอปเพนดรอฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendorff tube 1.5 mL; CLP, U.S.A.)

- ตู้เย็น (Thai Stanless Argon, Thailand) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 4°C

3.3.3 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบความเป็นพิษของซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดง ใช้อุปกรณ์ทั้งหมดในกลุ่ม 3.2.1 ค. 3.2.1 ง. และ 3.2.2 ก. มีอุปกรณ์ที่ใช้เพิ่มเติม คือ

- Yellow tip ขนาด 200 ไมโครลิตร (Corning Corporation, U.S.A)

- Automatic pipette ขนาด 20-200 และ 5-40 ไมโครลิตร (ยี่ห้อ Nichipet EX, Nichiryo, Japan)

- หลอดเอปเพนดรอฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendorff tube 1.5 mL; CLP, U.S.A.)

- ชุดตรวจนับปริมาณเซลล์ (Hemocytometer; ยี่ห้อ Bright-Line, Hausser Scientific, U.S.A.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ถาดทดสอบสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี 96 หลุม (96-well Culture Plate; Corning Corporation, U.S.A.)

- ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon Dioxide Water-Jacketed Incubator; Nuair, U.S.A.)

- กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงสว่างธรรมดา (Light microscope; Olympus, Japan)

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้กับถาดทดสอบชนิด 96 หลุม (Bio Kinetics Reader; รุ่น EL 340, BIO-TEK instruments. Inc., U.S.A.)

3.4 วัสดุอุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดง

3.4.1 วัสดุสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณของซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดง โดยวิธีการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ใช้วัสดุทั้งหมดในกลุ่ม 3.3.1 ก. และมีวัสดุที่ใช้เพิ่มเติมคือ

- ตัวอย่างข้าวที่ไม่ได้หมักกับเชื้อราสำหรับใช้เป็น ชุดทดสอบควบคุม (blank) ในการตรวจด้วยวิธีการ HPLC

- Isopropanol HPLC grade ($CH_3CH_2CH_2OH$, Fisher Scientific, U.K.)

- Acetonitrile HPLC grade (CH_3CN, Fisher Scientific, U.K.)

- Orthophosphoric acid HPLC grade (H_3PO_4, Ajax Finechem, Australia)

3.4.2 อุปกรณ์สำหรับตรวจหาปริมาณของซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดง ใช้อุปกรณ์ทั้งหมดในกลุ่ม 3.2.1 ข. และมีอุปกรณ์ที่ใช้เพิ่มเติมคือ

- แผ่นเยื่อกรองทำด้วยเซลลูโลสอะซิเตต

- ขวดแก้วทนความร้อนสูงขนาด 1,000 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany) สำหรับบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งประกอบด้วย กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล อะซิโตไนไตรล์ และไอโซโพรพานอล ในอัตราส่วน 55 : 35 : 10 โดยปริมาตร ที่ผ่านการกรองแล้ว

- ขวดไวเอิลบรรจุสารขนาด 1.5 และ 5 มิลลิลิตร (Vial 1.5 and 5 mL; Sun-Sri, U.S.A.) สำหรับทำการตรวจด้วยวิธีการ HPLC

- ขวดแก้วสีชา ขนาด 8 มิลลิลิตร (Amber glass vial 8mL; Wheaton, U.S.A.)

3.5 เครื่องประมวลผลทางสถิติ

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล

- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft excel 98 (Microsoft corp., U.S.A.)

- โปรแกรมสำเร็จรูป ED50V1.0 (Mario H. Vargus.,de Enfermedades National Resiratorias.,Mexico)

- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0 (SPSS Inc., U.S.A.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- โปรแกรมสำเร็จรูป Sigma plot 8.0 (SPSS Inc., U.S.A.)

3.6 แผนการทดลอง

แบ่งออกเป็น 4 ตอน คือ

3.6.1 การทดลองตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่มีต้นกำเนิดจากไตของตัวอ่อนของมนุษย์ (HEK293T) ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

การทดลองนี้ประกอบด้วย การเตรียมอาหารสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T การนำเซลล์ HEK293T มาทำการเพาะเลี้ยงจนมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น และการจัดการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T ให้สมบูรณ์แข็งแรงก่อนนำไปทำการทดลอง

3.6.1.1 การเตรียมอาหารสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T (Incomplete RPMI-1640, 10% Fetal bovine serum ใน Incomplete RPMI-1640 หรือ Complete RPMI-1640, และ Freezing medium)

ก. การเตรียม Penicillin-Streptomycin solution และ Fetal bovine serum (FBS)

1. นำขวดบรรจุ Penicillin-Streptomycin solution และขวดบรรจุ Fetal bovine serum (FBS) ออกมาจากตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่รอ ให้เตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต โดยตั้งเวลาในการฉายแสงอัลตร้าไวโอเลตนาน 30 นาที เมื่อแสงอัลตร้าไวโอเลตดับลง ให้เลื่อนเปิดฝาของตู้ลามินาร์โฟล์ขึ้นมาประมาณ 30 เซนติเมตร ฉีดสเปรย์เอทานอลเข้มข้น 70% ลงบนพื้นภายในตู้ลามินาร์โฟล์ และเช็ดซ้ำด้วยผ้าสะอาดชุบเอทานอลเข้มข้น 70% จากนั้นให้เปิดปุ่มหลอดไฟให้แสงสว่าง และปุ่มสำหรับทำให้อากาศหมุนเวียนภายในตู้ลามินาร์โฟล์ (blower)

2. เมื่อ Penicillin-Streptomycin solution ภายในขวดบรรจุละลายหมดแล้ว ให้นำเข้าไปภายในตู้ลามินาร์โฟล์ พร้อมกับนำอุปกรณ์ทั้งหมดที่จะใช้ มาฉีดสเปรย์เอทานอลเข้มข้น 70% ลงบนพื้นผิวของอุปกรณ์แต่ละชนิด และเช็ดซ้ำด้วยผ้าสะอาดชุบเอทานอลเข้มข้น 70% เพื่อทำให้อุปกรณ์ทั้งหมดมีความปลอดเชื้อมากที่สุด (aseptic technique : อ้างใน กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนกิจ, 2547) ก่อนนำเข้าในตู้ลามินาร์โฟล์

3. เมื่อ Fetal bovine serum ภายในขวดบรรจุละลายหมดแล้ว นำขวดบรรจุ Fetal bovine serum มาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของคอมพลีเมนต์ (complements) ต่าง ๆ ภายในซีรั่ม นำขวดบรรจุ Fetal bovine serum เข้าไปภายในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ทำการดูด Fetal bovine serum มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตรจำนวน 10 หลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การเตรียม Incomplete RPMI-1640

1. เปิดซองบรรจุผง RPMI-1640 เทลงไปในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วชั่ง $NaHCO_3$ จำนวน 2.0 กรัมเติมลงไป จากนั้นเติมน้ำปลอดอิออนประมาณ 700 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งสารทั้งหมดละลาย ทำการปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 โดยใช้กรดอะซิติก (gracial acetic acid) เข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำปลอดอิออน ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ได้ Incomplete RPMI-1640 ที่มีสีแดงใส

2. ทำการฆ่าเชื้อ Incomplete RPMI-1640 โดยใช้ชุดกรองสารละลายแบบสุญญากาศ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้แผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน พร้อมกับปั๊มสุญญากาศ

3. นำชุดกรองทั้งหมดเข้าไปในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ถอดถ้วยรองรับสาร และฐานสำหรับทำการกรองออกจากขวดรูปชมพู่ที่ใช้รองรับสาร ดึงสำลีออกจากข้อต่อของขวดรูปชมพู่ แล้วเท Incomplete RPMI-1640 จากขวดรูปชมพู่ลงสู่ขวดแก้วทนความร้อนขนาด 1,000 มิลลิลิตรให้หมด ดูด Incomplete RPMI-1640 มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร 2 หลอด หลอดละ 40 มิลลิลิตร

ค. ทำการเตรียม Complete RPMI-1640

1. ดูด Fetal bovine serum จำนวน 20 มิลลิลิตร เติมลงในขวดแก้วทนความร้อนขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นดูด Penicillin-Streptomycin solution จำนวน 2,000 ไมโครลิตร มาเติมลงในขวดแก้วเดียวกันนี้

2. ดูด Incomplete RPMI-1640 (จากขวดบรรจุในข้อ ข 3.) จำนวน 178 มิลลิลิตร มาเติมลงในขวดแก้วในข้อ ค 1. ข้างบนนี้ จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ได้ Complete RPMI-1640 ที่มีสีชมพูเข้ม

หมายเหตุ เมื่อใช้ Complete RPMI-1640 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T และในการทดลอง จนใกล้จะหมด ก็ให้เตรียมขึ้นใหม่ดังขั้นตอนในข้อ ค. ข้างบนนี้ พร้อมกับทำการตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพ (sterility test) ตามขั้นตอนในข้อ จ.

ง. การเตรียม Freezing medium

1. ดูด Incomplete RPMI-1640 (จากขวดบรรจุในข้อ ข 3.) จำนวน 6.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร และดูด DMSO จำนวน 1,000 ไมโครลิตร และดูด Fetal bovine serum จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เติมตามลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์เดียวกันนี้ ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ได้ Freezing medium ที่มีสีส้มอมแดง ลักษณะใส ใช้ในการแช่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แข็งเซลล์ HEK293T ที่อุณหภูมิ -70°C โดยมี DMSO เป็นสารป้องกันไม่ให้เซลล์แตกสลายในระหว่างการแช่แข็ง และการละลายเซลล์เพื่อนำมาเพาะเลี้ยง (Butler, 2004)

จ. การตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพ ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้น

1. ดูด Freezing medium (ในข้อ ง 1.), Complete RPMI-1640 (ในข้อค2.), Incomplete RPMI-1640 จาก หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรทั้งสองหลอด (ในข้อ ข 3.), และดูด Incomplete RPMI-1640 จากขวดบรรจุ (ในข้อ ข 3.) มาอย่างละ 500 ไมโครลิตร เติมลงในถาดทดสอบชนิด 24 หลุม สารละหลุม

2. นำถาดทดสอบชนิด 24 หลุม เช็ดด้วยผ้าสะอาดชุบเอทานอลเข้มข้น 70% (เป็นวิธีการปลอดเชื้อ) ก่อนเข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% นาน 48 ชั่วโมง

3. ให้นำภาชนะบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดในข้อ ข 3. ค 2. และ ง 1. มาปิดผนึกด้วยแผ่นพาราฟินตรงบริเวณรอยต่อของฝากับตัวภาชนะบรรจุ แล้วนำเข้าเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C จะนำอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดนี้ไปใช้งานได้ ก็ต้องผ่านการตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพแล้วเท่านั้น สำหรับอุปกรณ์อื่นให้เก็บเข้าตู้ ณ อุณหภูมิห้องตามเดิม และทำความสะอาดพื้นภายในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วย เอทานอลเข้มข้น 70% แล้วเลื่อนปิดฝาตู้ โดยให้ปฏิบัติกับภาชนะบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกชนิด หรือภาชนะที่บรรจุสารเคมีซึ่งใช้ในปฏิบัติการเกี่ยวกับเซลล์เพาะเลี้ยงก่อนนำเก็บเข้าที่ และทำความสะอาดพื้นภายในตู้ลามินาร์โฟล์ตามวิธีการในข้อ จ 3. นี้ทุกครั้งหลังเสร็จจากปฏิบัติการเกี่ยวกับเซลล์ HEK293T

4. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ให้นำถาดทดสอบข้างบนนี้ ไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 20-40 เท่า โดยใช้ฟิลด์ปกติในการส่องตรวจ

การแปลผล (อ้างใน กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนกิจ, 2547) ถ้าส่องตรวจไม่พบเชื้อจุลชีพ เช่น เซลล์แบคทีเรีย สายใยของเชื้อรา และเซลล์ของยีสต์ ให้ถือว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านการตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพ แต่ถ้าส่องตรวจพบเชื้อจุลชีพดังกล่าว ให้ถือว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผ่านการตรวจสอบ

จากการตรวจสอบพบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด คือ Incomplete RPMI-1640, Complete RPMI-1640, และ Freezing medium ผ่านการตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพ สามารถนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T ได้ เสร็จแล้วนำถาดทดสอบชนิด 24 หลุมที่ผ่านการทดสอบนี้ บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.1.2 การนำเซลล์ HEK293T มาทำการเพาะเลี้ยงให้มีปริมาณมากขึ้น

ก. การเตรียมตู้ลามินาร์โฟลให้ปลอดเชื้อ และการนำวัสดุอุปกรณ์เข้าในตู้ลามินาร์โฟล์

1. เตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อเช่นเดียวกับข้อ ก 1. ของหัวข้อ 3.6.1.1 แล้วนำอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ เหมือนกับข้อ ก 2. ของหัวข้อ 3.6.1.1

2. นำขวดบรรจุ Complete RPMI-1640 และหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตรที่บรรจุ Incomplete RPMI-1640 1 หลอด ออกมาจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นำมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที ทั้งนี้เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับ 37°C ซึ่งจะทำให้เซลล์มีการฟื้นตัวจากสภาพแช่แข็ง และส่งผลให้เซลล์มีการเจริญดีขึ้น (Butler, 2004) เสร็จแล้วเช็ดขวดและหลอดเซนตริฟิวจ์ดังกล่าวด้วยผ้าแห้งที่สะอาด แล้วนำเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

ข. การล้าง Freezing medium ออกจากเซลล์ HEK293T

1. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรออกมา 2 หลอด ดูด Incomplete RPMI-1640จำนวน 8 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15มิลลิลิตรหนึ่งหลอด

2. นำหลอดไครโอบรรจุเซลล์ HEK293T ออกมาจากตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ-70°C แช่ในถาดพลาสติกแข็งบรรจุน้ำแข็ง รีบนำหลอดไครโอนี้ลงแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 2 นาที จนสารละลายภายในหลอดไครโอมีการละลายเกือบหมด ให้รีบนำหลอดไครโอเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ การที่ต้องรีบทำการละลายเซลล์ HEK293T ภายในหลอดไครโออย่างรวดเร็ว เพื่อที่จะทำให้เซลล์ HEK293T มีการฟื้นตัวจากสภาพแช่แข็งได้เร็ว และมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงขึ้น (Bultler, 2004)

3. ดูดสารละลายทั้งหมดภายในหลอดไครโอนี้ มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี Incomplete RPMI-1640 ในข้อ ข 1. จากนั้นนำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรทั้ง 2 หลอดนี้ออกมานอกตู้ลามินาร์โฟล์ เติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เป็นหลอดเปล่า ให้มีระดับปริมาตรเดียวกับหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี Incomplete RPMI-1640 ผสมกับสารละลายเซลล์จากหลอดไครโอ นำหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้งสองหลอดนี้มาเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้ง 2 หลอดนี้เข้าในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

ค. การถ่ายเซลล์ HEK293T ลงเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์

1. ดูด Complete RPMI-1640 จำนวน 4.5 มิลลิลิตรเติมลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ดูดสารละลายในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี Incomplete RPMI-1640 ผสมกับสารละลายเซลล์จาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลอดไครโอออกมาทิ้งให้หมด จนเหลือแต่เซลล์ HEK293T ที่ตกตะกอนรวมกันเป็นก้อน (pellet) ที่ก้นหลอด แล้วทำการผสมเซลล์ HEK293T นี้กับ Complete RPMI-1640 จำนวน 500 ไมโครลิตร ให้ทั่วถึงกัน โดยการดูดขึ้น-ลงประมาณ 7 ครั้ง ดูด Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T นี้ จำนวน 400 ไมโครลิตร เติมลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว

2. จับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ หมุนวนเบา ๆ เพื่อทำให้เซลล์ HEK293T กระจายตัวไปทั่วพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 20-40 เท่า เลือกฟิลด์ที่ใช้ในการตรวจดูเซลล์เป็น phase-contrast สังเกตเห็นว่าเซลล์ HEK293T มีการกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอภายในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete RPMI-1640) ดังแสดงในภาพที่ ก-2 ของภาคผนวก ก. จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้เข้าบ่มภายในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% ด้วยวิธีการปลอดเชื้อเหมือนกับในข้อ จ 2. ของหัวข้อ 3.6.1.1 นาน 24 ชั่วโมง

3. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ให้นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ในข้อ ค 2. ออกจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ โดยปิดฝาขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ให้สนิท (ทุกครั้งก่อนนำออกมาจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์) นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ ไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับตามวิธีการในข้อ ค 2. เมื่อพบว่าเซลล์ HEK293T มีการเจริญเกาะกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ดีแล้ว ก็สามารถทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ไปเก็บในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิม

ง. การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete RPMI-1640) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T นาน 24 ชั่วโมง

1. ทำการเตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เหมือนกับในข้อ ก 1. ของหัวข้อ 3.6.1.1 แล้วนำอุปกรณ์ที่จะใช้ เข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อเหมือนกับในข้อ ก 2. ของหัวข้อ 3.6.1.1

2. นำขวดบรรจุ Complete RPMI-1640 ออกมาจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C มาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที ก่อนนำเข้าไปในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ เหมือนกับในข้อ ก 2. จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ในข้อ ค 3. และถาดทดสอบชนิด 24 หลุมที่ใช้ในการตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพของอาหารเลี้ยงเซลล์ ในข้อ จ 4. ของหัวข้อ 3.6.1.1 ออกจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เช็ดด้วยผ้าสะอาดชุบเอทานอลเข้มข้น 70% (เป็นวิธีการปลอดเชื้อ) ก่อนนำเข้าไปในตู้ลามินาร์โฟล์

3. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ออกทิ้งให้หมด แล้วเติม Complete RPMI-1640 ใหม่จำนวน 5 มิลลิลิตรในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ จากนั้นดูด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Complete RPMI-1640 จำนวน 500ไมโครลิตร เติมลงไปในหลุมหนึ่งของถาดทดสอบชนิด 24 หลุม เพื่อนำไปตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพที่ระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง ตามขั้นตอนในข้อ จ 4. ของหัวข้อ 3.6.1.1 ก่อนนำ Complete RPMI-1640 มาใช้ในครั้งต่อไป

4. นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และถาดทดสอบชนิด 24 หลุมในข้อ ง 3. ออกจากตู้ลามินาร์โฟล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T นาน 96 ชั่วโมง แล้วจึงค่อยตรวจสอบสภาพเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้

จ. การแบ่งถ่ายเซลล์ HEK293T มาเพาะเลี้ยงเพิ่มในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงมาได้นาน 96 ชั่วโมง (subculture)

1. หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ในข้อ ง 4. นาน 96 ชั่วโมง ให้นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อดูจากภายนอกสีของอาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนจากสีชมพูเข้มเป็นสีเหลือง และที่เห็นเป็นจุดสีขาวเกาะอยู่เต็มพื้นผิวภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์คือ เซลล์ HEK293T มีการเจริญเพิ่มจำนวนจนเต็มพื้นผิว นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ ไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับตามวิธีการในข้อ ค 2. พบว่าเซลล์ HEK293T มีการเจริญ 90% (ค่า Confluence = 90%) ดังแสดงในภาพที่ ก-3 ของภาคผนวก ก. สามารถที่จะทำการลดปริมาณเซลล์ HEK293T เพื่อทำให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนต่อไป (subculture) ได้ นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิม

2. ทำการเตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เหมือนกับในข้อ ก 1. ของหัวข้อ 3.6.1.1 นำวัสดุอุปกรณ์ทั้งหมดที่จะใช้ เข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อเหมือนกับในข้อ ก 2. ของหัวข้อ 3.6.1.1

3. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่บรรจุ Incomplete RPMI-1640 และขวดบรรจุ Complete RPMI-1640 ออกจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C มาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที ทั้งนี้เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ป้องกันไม่ให้เซลล์ HEK293T ตายจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Freshney, 2000) จากนั้นเช็ดภาชนะทั้งสองนี้ด้วยผ้าแห้งที่สะอาด ก่อนนำเข้าไปในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อเหมือนกับในข้อ ก 2. ของหัวข้อ 3.6.1.1

4. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรออกมาเตรียมไว้ 2 หลอด ดูด Incomplete RPMI-1640 จำนวน 7 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรหนึ่งหลอด จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ HEK293T ในข้อ จ 1.ออกจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ นำเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกทิ้งจนหมด ต่อจากนั้นดูดสารละลาย EDTA ใน Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 3 มิลลิลิตร เติมในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำการจับเวลาไว้ 20 วินาที

5. เมื่อครบ 20 วินาที ทำการชะล้างเซลล์ HEK293T ให้หลุดออกจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และไหลมาอยู่รวมกันตรงมุมหนึ่งของก้นขวดเพาะเลี้ยงเซลล์จนหมด แล้วดูดสารละลาย EDTA ใน Phosphate buffer saline ที่มีเซลล์ HEK293T มาเติมในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี Incomplete RPMI-1640 ในข้อ จ 4.ให้หมด

6. นำ หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรทั้งสองหลอดนี้ ออกมานอกตู้ลามินาร์โฟล์ เติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เป็นหลอดเปล่า ให้มีระดับปริมาตรเดียวกับหลอดที่มี Incomplete RPMI-1640 และเซลล์ HEK293T โดยหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นนี้ ให้ปรับปริมาณน้ำกลั่น จนมีระดับปริมาตรเดียวกับหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ และเซลล์ HEK293T ก่อนจะทำการปั่นเหวี่ยงทุกครั้ง นำหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้งสองหลอดนี้ มาเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 rpm นาน 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี Incomplete RPMI-1640 และเซลล์ HEK293T เช็ดด้วยผ้าสะอาดชุบเอทานอลเข้มข้น 70% (เป็นวิธีการปลอดเชื้อ) ก่อนนำเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ แช่หลอดไครโอในถาดพลาสติกบรรจุน้ำแข็ง เพื่อทำให้อุณหภูมิของหลอดไครโอใกล้เคียงกับอุณหภูมิของ Freezing medium

7. ดูดสารละลายทั้งหมดภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อ จ 6.ทิ้ง จนเหลือแต่เซลล์ที่ตกตะกอนรวมกันเป็นก้อน (pellet) ที่ก้นหลอด แล้วทำการผสมเซลล์ดังกล่าวกับ Incomplete RPMI-1640 จำนวน 1,000 ไมโครลิตรให้ทั่วถึงกัน โดยการดูดขึ้น-ลง ประมาณ 40 ครั้ง

8. ทำการล้างภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ในข้อ จ 5. อีกครั้ง ด้วย Incomplete RPMI-1640 จำนวน 3 มิลลิลิตร เพื่อใช้ล้างเอาสารละลาย EDTA ใน Phosphate buffer saline และเซลล์ HEK293T ที่เหลืออยู่ออกแล้วดูดทิ้งไป จากนั้นเติม Incomplete RPMI-1640 ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อ จ 7. อีกจำนวน7มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดเซนตริฟิวจ์นี้ไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 rpm นาน 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง แล้วนำหลอดเซนตริฟิวจ์นี้ เข้าไปภายในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อตามข้อ จ 6.

9. ดูด Complete RPMI-1640 มาเติมเข้าไปในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์อันเดิมในข้อ จ 8. และขวดเพาะเลี้ยงเซลล์อันใหม่อันละ 4.5 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นดูดของเหลวภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี Incomplete RPMI-1640 และเซลล์ HEK293T ในข้อ จ 8. ทิ้ง จนเหลือแต่เซลล์ที่ตกตะกอนรวมกันเป็นก้อน (pellet) ที่ก้นหลอด ทำการผสมเซลล์ดังกล่าวกับ Complete RPMI-1640 จำนวน 1,000 ไมโครลิตรให้ทั่วถึงกัน โดยการดูดขึ้น-ลงประมาณ 40 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. ดูด Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T เติมในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันในข้อ จ 9. อันละ 200 ไมโครลิตร จับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละอันหมุนวนเบา ๆ เพื่อทำให้เซลล์ HEK293T กระจายตัวไปทั่วพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้ ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อพบว่าเซลล์ HEK293T มีการกระจายตัวสม่ำเสมอดีแล้ว ให้นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% นาน 96 ชั่วโมง

ฉ. การนำเซลล์ HEK293T ที่เหลือมาทำการแช่แข็งเพื่อเก็บรักษาไว้ และการเตรียม Complete RPMI-1640 และ Incomplete RPMI-1640 มาตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพก่อนนำมาใช้งานในครั้งต่อไป

1. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรที่มี Complete RPMI-1640 และเซลล์ HEK293T ที่เหลืออยู่จากข้อ จ 10. ไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 rpm นาน 5 นาที จากนั้นให้นำหลอดเซนตริฟิวจ์นี้ พร้อมกับนำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรที่บรรจุ Freezing medium และขวดบรรจุ Incomplete RPMI-1640 ออกจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C และนำถาดทดสอบชนิด 24 หลุมที่ใช้ในการตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพของอาหารเลี้ยงเซลล์ ออกจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เข้าไปภายในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ เหมือนกับในข้อ ก 2. ของหัวข้อ 3.6.1.1

2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมจากหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อ ฉ 1. ออกทิ้งให้หมด จนเหลือเซลล์ที่ตกตะกอนรวมกันเป็นก้อน (pellet) ที่ก้นหลอด ทำการผสมเซลล์ดังกล่าวกับ Freezing medium จำนวน 1,000 ไมโครลิตรให้ทั่วถึงกัน โดยการดูดขึ้น-ลง ประมาณ 4 ครั้ง นำหลอดไครโอในข้อ จ 6. เข้ามาภายในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ แล้วดูด Freezing medium ที่มีเซลล์ HEK293T ทั้งหมด มาเติมลงในหลอดไครโอนี้ เสร็จแล้วนำหลอดไครโอนี้แช่ลงในถาดพลาสติกแข็งบรรจุน้ำแข็ง รีบนำหลอดไครโอดังกล่าวไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C

3. เตรียมหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร 2 หลอด ดูด Incomplete RPMI-1640 จากขวดบรรจุ เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้ง 2 หลอดนี้ หลอดละ 40 มิลลิลิตร ทำการดูด Incomplete RPMI-1640 จากขวดบรรจุ และจากหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้ง 2 หลอดนี้ มาอย่างละ 500 ไมโครลิตร เติมลงในถาดทดสอบชนิด 24 หลุมในข้อ ฉ 1. สารละ 1 หลุม

4. ทำการดูด Complete RPMI-1640 จำนวน 500 ไมโครลิตร เติมลงในถาดทดสอบชนิด 24 หลุมนี้ จำนวน 1 หลุม เสร็จแล้วนำถาดทดสอบชนิด 24 หลุม เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิม นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Incomplete RPMI-1640 และ Complete RPMI-1640 ในหลุมดังกล่าวตามขั้นตอนในข้อ จ 4. ของหัวข้อ 3.6.1.1 ก่อนนำ Incomplete RPMI-1640, และ Complete RPMI-1640 มาใช้ในครั้งต่อไป

3.6.1.3 การจัดการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T ให้สมบูรณ์แข็งแรงก่อนนำเซลล์ไปทำการทดลอง

1. ทำการตรวจสอบการเจริญของเซลล์ HEK293T ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันในข้อ จ 10. ของหัวข้อ 3.6.1.2 ตามวิธีการในข้อ จ 1. ของหัวข้อ 3.6.1.2 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อพบว่าเซลล์ HEK293T ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้ มีการเจริญประมาณ 90% (ค่า Confluence = 90%) สามารถที่จะทำการ subculture เซลล์ HEK293T ได้

2. ทำการเตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำวัสดุอุปกรณ์ที่จะใช้ทั้งหมด เข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ พร้อมกับทำการอุ่น Incomplete RPMI-1640 และ Complete RPMI-1640 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที ก่อนนำเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ

3. นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 อันเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 อันออกมาทิ้งจนหมด ต่อจากนั้นทำการชะล้างเอาเซลล์ HEK293T จากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละอัน โดยใช้สารละลาย EDTA ใน Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ แล้วดูดมาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรซึ่งเติม Incomplete RPMI-1640 จำนวน 7 มิลลิลิตร ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ละหลอด

4. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีเซลล์ HEK293T ทั้งสองหลอดนี้ ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 rpm นาน 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง แล้วดูดของเหลวทั้งหมดภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้ง 2 หลอดนี้ทิ้งภายในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ ทำการผสมเซลล์ HEK293T ภายในหลอดเซนตริฟิวจ์แต่ละหลอดด้วย Incomplete RPMI-1640 หลอดละ 1,000 ไมโครลิตร แล้วดูดมารวมในหลอดเซนตริฟิวจ์เดียวกัน เติม Incomplete RPMI-1640 ลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์นี้อีกจำนวน 8 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดเซนตริฟิวจ์ดังกล่าวนี้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 rpm นาน 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง

5. ทำการล้างภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 อันนี้ด้วย Incomplete RPMI-1640 อันละ 3 มิลลิลิตรแล้วดูดทิ้ง ดูดของเหลวในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่นำไปทำการปั่นเหวี่ยงครั้งหลังสุดในข้อ 4 ทิ้งให้หมด แล้วทำการผสมเซลล์ HEK293T ภายในหลอดเซนตริฟิวจ์นี้ให้เข้ากับ Complete RPMI-1640 จำนวน 1,500 ไมโครลิตร

6. เติม Complete RPMI-1640 ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์อันละ 4.5 มิลลิลิตร และดูดสารละลายเซลล์ HEK293T จากข้อ 5. มาเติมลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์อันละ 200 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้ ไปตรวจดูการกระจายตัวของเซลล์ HEK293T ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อพบว่าเซลล์ HEK293T ภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันมีการกระจายตัวดีแล้ว จึงนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้ เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

7. สุดท้ายนำเซลล์ HEK293T ที่เหลือมาทำการแช่แข็งเพื่อเก็บรักษาไว้ และทำการเตรียม Complete RPMI-1640 และ Incomplete RPMI-1640 มาตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพก่อนนำมาใช้งานในครั้งต่อไป ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนเหมือนกับในข้อ ฉ 1.-ฉ 4. ของหัวข้อ 3.6.1.2

หมายเหตุ ให้ทำการ subculture เซลล์ HEK293T ภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้ตามขั้นตอนในข้อ 1-7 ของหัวข้อ 3.6.1.3 อีก 2 ครั้ง เพื่อทำให้เซลล์ HEK293T มีความแข็งแรงสมบูรณ์ดีขึ้น แล้วจึงเริ่มทำการทดสอบความเป็นพิษของ DMSO และ ซิตรินินในสารสกัดข้าวแดงต่อเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay ต่อไป การทำ subculture เซลล์ HEK293T ในหัวข้อ 3.6.1.3 นี้ ควรจะต้องทำ ทุก ๆ 96 ชั่วโมง

3.6.2 การทดลองตอนที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษของ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในสารสกัดจากตัวอย่างข้าวแดง ต่อเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

การทดลองนี้ประกอบด้วย การถ่ายเซลล์ HEK293T ลงเลี้ยงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม การเตรียมสารละลาย DMSO ใน Complete RPMI-1640 และการเติมสารละลายดังกล่าวลงในถาดทดสอบนี้ และการวัดค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

3.6.2.1 การถ่ายเซลล์ HEK293T ลงเลี้ยงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

ก. การถ่ายเซลล์ HEK293T จากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปตรวจนับปริมาณเซลล์

นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 อันที่ใช้เลี้ยงเซลล์ HEK293T มาตรวจสอบการเจริญของเซลล์ HEK293T พบว่าเซลล์ HEK293T มีการเจริญอยู่ที่ประมาณ 90% (90% confluence) จึงทำการถ่ายเซลล์ HEK293T จากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้ มาบรรจุในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรตามวิธีการในข้อ 1-4 ของหัวข้อ 3.6.1.3 แล้วดูด Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T มา 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อทำการตรวจนับปริมาณเซลล์ HEK293T

ข. การตรวจนับปริมาณเซลล์ HEK293T และการคำนวณหาปริมาณเซลล์ HEK293T และ Complete RPMI-1640 ที่จะใช้ถ่ายลงถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. นำหลอดเอปเพนดอร์ฟที่มีเซลล์ HEK293T ใน Complete RPMI-1640 จำนวน 100 ไมโครลิตรในข้อ ก. มาผสมให้เข้ากับ Trypan blue เข้มข้น 0.2% จำนวน 100 ไมโครลิตร โดยการดูดขึ้น-ลง 8 ครั้ง แล้วดูดสารละลายที่มีเซลล์ HEK293T นี้มาเติมลงในส่วนตรงกลางของชุดตรวจนับปริมาณเซลล์ (Hemocytometer) ซึ่งมีแผ่นสไลด์ปิดทับอยู่ โดยเติมสารละลายที่ขอบด้านบนและด้านล่าง ของส่วนตรงกลางนี้ ด้านละ 10 ไมโครลิตร ดังแสดงในภาพที่ ก-6 ของภาคผนวก ก.

2. นำชุดตรวจนับปริมาณเซลล์ ไปนับปริมาณเซลล์ HEK293T ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงสว่างธรรมดาที่กำลังขยาย 10 เท่า โดยนับปริมาณเซลล์ในพื้นที่ที่ใช้นับเซลล์เม็ดเลือด (พื้นที่ C1, C2, C3, และ C4 ในภาพที่ ก-6 ของภาคผนวก ก.) บันทึกปริมาณเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด โดยแยกปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตายแล้วออกจากกัน

หมายเหตุ การเติม Trypan blue เข้มข้น 0.2% ลงไปผสมกับสารละลายเซลล์ HEK293T ก็เพื่อแยกความแตกต่างของเซลล์ที่ตายแล้ว ออกจากเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยสี Trypan blue จะแทรกซึมเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่ตายแล้ว ทำให้เซลล์ที่ตายแล้วมีสีน้ำเงิน ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะไม่ติดสีดังกล่าว (Patterson, 1979 อ้างใน Butler M., 2004)

ตารางที่ 3.1 ผลการตรวจนับปริมาณเซลล์ HEK293T ในการทดลองตอนที่ 2 จากชุดตรวจนับ

ด้านบนของชุดตรวจนับปริมาณเซลล์		ด้านล่างของชุดตรวจนับปริมาณเซลล์	
เซลล์ที่มีชีวิตอยู่	เซลล์ที่ตายแล้ว	เซลล์ที่มีชีวิตอยู่	เซลล์ที่ตายแล้ว
86	5	103	1
93	6	94	2
72	5	82	3
66	5	87	9
รวม 317	รวม 21	รวม 366	รวม 15

3. ทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีอยู่ของเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (% Cell viability) จากสูตร

%Cell viability = ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด/ปริมาณเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด x 100

เมื่อแทนค่า จะได้ % Cell viability = (317+366) / (317+21+366+15) x 100 = 94.99%

ซึ่งปริมาณเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต มากพอสำหรับที่จะทำการถ่ายลงเพาะเลี้ยงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. คำนวณหาค่าปริมาณเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต / ไมโครลิตรของ Complete RPMI-1640 ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรที่เตรียมขึ้นในข้อ ก. จากสูตร

ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต / ไมโครลิตร = (ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดเฉลี่ย) x dilution factor x correction factor โดยที่

ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดเฉลี่ย = (ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด / 4) x 2 ซึ่งก็คือ ด้านทั้งสองของชุดตรวจนับปริมาณเซลล์ โดยแต่ละด้านมีช่องสำหรับใช้นับปริมาณเซลล์ 4 ช่อง

dilution factor คือ อัตราส่วนการใช้สารละลาย ระหว่าง Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T จำนวน 100 ไมโครลิตร กับ Trypan blue เข้มข้น 0.2% จำนวน 100 ไมโครลิตร เท่ากับ 1 : 1 ดังนั้น dilution factor เท่ากับ 2

correction factor คือ ค่าแก้ไขของปริมาณเซลล์ที่จะตรวจนับได้ภายในพื้นที่ที่ใช้นับในแต่ละด้าน เท่ากับ 1 / 4 x (0.1 x 1 x 1) = 2.5 โดยตัวเลขภายในวงเล็บคือ ความลึก ความกว้าง และความยาวของพื้นที่ที่ใช้ตรวจนับเซลล์ (พื้นที่ C1, C2, C3, และ C4 ในภาพที่ ก-6 ของภาคผนวก ก.) ซึ่งเท่ากับ 0.1, 1, และ 1 มิลลิเมตรตามลำดับ ผลคูณของทั้งสามค่านี้ คือ ปริมาตรสารละลายเซลล์ที่ในแต่ละพื้นที่จะรับได้ 4 คือจำนวนพื้นที่ที่ใช้ตรวจนับเซลล์ในแต่ละด้าน (Kuchler, 1977) เมื่อทำการแทนค่าทั้งหมด จะได้ ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต / ไมโครลิตร = (317+366/4)x2 x2 x2.5 = 1,707.5

5. คำนวณหาค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดใน Complete RPMI-1640 ภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรที่เตรียมขึ้นในข้อ ก. โดยในหลอดเซนตริฟิวจ์นี้มี Complete RPMI-1640 ทั้งหมด 1,500 ไมโครลิตร และใน 1 ไมโครลิตรของ Complete RPMI-1640 มีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต 1,707.5 เซลล์ ดังนั้นใน Complete RPMI-1640 1,500 ไมโครลิตร จะมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตอยู่เท่ากับ 1,500 x 1,707.5 = 2,561,250 เซลล์ หรือ 2.56×10^6 เซลล์

6. คำนวณหาปริมาณ Complete RPMI-1640 และเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต ซึ่งจะใช้ในการถ่ายลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม โดยกำหนดให้ 1 หลุมภายในถาดทดสอบมี Complete RPMI-1640 ซึ่งมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตจำนวน 100 ไมโครลิตร ดังนั้นถ้ามี 96 หลุมภายในถาดทดสอบ จะต้องใช้ Complete RPMI-1640 ซึ่งมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตจำนวน 9,600 ไมโครลิตร แต่ในการเตรียมต้องเผื่อความคลาดเคลื่อนที่จะเกิดขึ้น คือต้องเตรียม 100 หลุม ดังนั้นจะต้องใช้ Complete RPMI-1640 ซึ่งมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต ทั้งหมด 10,000 ไมโครลิตร (10 มิลลิลิตร)

กำหนดให้ 1 หลุมภายในถาดทดสอบมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต จำนวน 5,000 เซลล์ ดังนั้นถ้ามี 100 หลุมภายในถาดทดสอบ จะต้องใช้เซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตเท่ากับ $5,000 \times 100 = 5 \times 10^5$ เซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นคำนวณหาปริมาณ Complete RPMI-1640 ซึ่งมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต ภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรจากข้อ ก. ที่จะต้องนำมาใช้

เซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต 2.56 x 10^6 เซลล์ มีอยู่ใน Complete RPMI-1640 จำนวน 1,500 ไมโครลิตร ต้องการใช้เซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตทั้งหมด 5 x 10^5 เซลล์ จะต้องนำ Complete RPMI-1640 นี้มาใช้จำนวน = (1,500 x 5 x10^5) / 2.56 x 10^6 = 7.55 x10^8 / 2.56 x 10^6 = 293 ไมโครลิตร

ค. การเตรียม Complete RPMI-1640 ซึ่งมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต ถ่ายลงถาดทดสอบชนิด 96 หลุม และการแบ่งเซลล์ HEK293T ที่เหลือลงเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอัน

1. ดูด Complete RPMI-1640 จำนวน 10 มิลลิลิตรมาเติมลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วดูด Complete RPMI-1640 นี้ทิ้งไป 293 ไมโครลิตร จากนั้นทำการดูดเซลล์ HEK293T ที่อยู่ใน Complete RPMI-1640 จำนวน 1,500 ไมโครลิตรจากข้อ ก จำนวน 293 ไมโครลิตรเติมลงไปแทนทำการผสมให้เข้ากัน โดยการดูดขึ้น-ลง 3-4 ครั้ง

2. ดูด Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T จากหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรในข้อ ค 1. มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมจนครบทุกหลุม ปิดฝาถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ทำการแบ่งบริเวณของหลุมที่จะใช้เติมสารละลายทดสอบ ในวันรุ่งขึ้นบนฝาถาด ดังตารางที่ 3.2

3. นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 20 เท่า โดยใช้ฟิลด์ในการส่องตรวจเป็น phase-contrast เพื่อตรวจดูการกระจายตัวของเซลล์ HEK293T ภายในแต่ละหลุมของถาดทดสอบ เมื่อพบว่าเซลล์ HEK293T ในแต่ละหลุมมีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอดีแล้ว ให้นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ถ้าเซลล์ภายในหลุมของถาดทดสอบ มีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ เช่น มีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มหนาแน่น ณ บริเวณใดบริเวณหนึ่งของถาดทดสอบ เมื่อเติมสารละลายทดสอบลงในหลุมดังกล่าว จะทำให้เซลล์ที่อยู่ด้านในได้รับสารทดสอบน้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ทางด้านนอก อาจทำให้ผลการทดสอบการเกิดพิษต่อเซลล์ โดยดูจากการมีชีวิตรอดของเซลล์เกิดความคลาดเคลื่อนได้ ถ้าเซลล์ในหลุมมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จะมีโอกาสสูงที่ทุกเซลล์ในหลุมนั้น จะได้รับสารทดสอบที่เติมลงไปเท่า ๆ กัน ทำให้ผลการทดสอบการเกิดพิษต่อเซลล์ โดยดูจากการมีชีวิตรอดของเซลล์เกิดความคลาดเคลื่อนน้อยมาก (Freshney, 2000) ในการตรวจถาดทดสอบหากพบว่าหลุมใดมีการกระจายตัวของเซลล์ ไม่สม่ำเสมอควรตัดหลุมนั้นออกจากการทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ทำการล้างภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันด้วย Incomplete RPMI-1640 แล้วดูดทิ้ง เติม Complete RPMI-1640 ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้อันละ 4.5 มิลลิลิตร ตามวิธีการในข้อ 5 และ 6 ของหัวข้อ 3.6.1.3 จากนั้นดูดเซลล์ HEK293T ใน Complete RPMI-1640 ที่เหลือภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อ ค 1. มาเติมเข้าไปในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 อัน อันละ 200 ไมโครลิตร

5. จับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละอันหมุนวนเบา ๆ เพื่อทำให้เซลล์ HEK293T กระจายตัวไปทั่วพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อพบว่าเซลล์ HEK293T มีการกระจายตัวสม่ำเสมอดีแล้ว ให้นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้ เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% นาน 96 ชั่วโมง

6. นำเซลล์ HEK293T ที่เหลืออยู่มาทำการแช่แข็งเพื่อเก็บรักษาไว้ และทำการเตรียม Complete RPMI-1640 และ Incomplete RPMI-1640 มาตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพ ก่อนนำมาใช้งานในครั้งต่อไป ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนเหมือนกับในข้อ ฉ 1.-ฉ 5. ของหัวข้อ 3.6.1.2

3.6.2.2 การเตรียมสารละลาย DMSO ใน Complete RPMI-1640 และการนำสารละลายดังกล่าวมาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมที่เตรียมขึ้น

1. ทำการเตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ ตามวิธีการในข้อ ก 1. ของหัวข้อ 3.6.1.1 แต่ไม่ต้องเปิดหลอดไฟให้แสงสว่าง นำวัสดุอุปกรณ์ที่จะใช้ทั้งหมด นำเข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

2. นำขวดบรรจุ Complete RPMI-1640 ออกมาจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นำมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 °C นาน 15 นาที แล้วนำเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ จากนั้นนำหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตรออกมาเตรียมรอไว้จำนวน 4 หลอด แล้วดูด Complete RPMI-1640 มาเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟดังกล่าว หลอดละ 350 ไมโครลิตร

3. ทำการเตรียม Complete RPMI-1640 ในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1, 2, 3, และ 4 ในข้อ 2. ให้มี DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายตามลำดับ เมื่อเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม โดยดูด Complete RPMI-1640 ในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1, 2, 3, และ 4 ทิ้งไป 7, 14, 21, และ 28 ไมโครลิตรตามลำดับ แล้วเติม DMSO เข้มข้น 99.95% จำนวน 7, 14, 21, และ 28 ไมโครลิตรลงไปแทนตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้น-ลง 3-4 ครั้ง

4. นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมในข้อ ค 3. ของหัวข้อ 3.6.2.1 ออกมาจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ นำเข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ทำการดูดสารละลาย DMSO

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย เติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้ก่อน โดยเติมสารละลายดังกล่าวหลุมละ 100 ไมโครลิตร จนครบ 3 หลุมตามตารางที่ 3.2 ต่อจากนั้นดูดสารละลาย DMSO เข้มข้น 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย เติมลงในถาดทดสอบเดียวกันนี้ สารละลายละ 3 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตรตามตารางที่ 3.2

5. ทำการดูด Complete RPMI-1640 มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมถาดเดิม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จนครบ 3 หลุมตามตารางที่ 3.2 โดยทั้ง 3 หลุมนี้จะใช้เป็น cell control จากนั้นจับถาดทดสอบชนิด 96 หลุมเคาะอย่างเบามือที่ขอบด้านหน้า-หลัง และด้านซ้าย-ขวา ด้านละ 4-5 ครั้ง เพื่อให้สารละลายทดสอบที่เติมลงไปในทุกหลุม ผสมเข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมในแต่ละหลุม จากนั้นนำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมดังกล่าว กลับเข้าไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิมนาน 72 ชั่วโมง เพื่อต้องการให้เห็นผลของการเกิดพิษต่อเซลล์ HEK293T สูงที่สุด (Kitabatake et al., 1993 และ Liu et al., 2003) ก่อนจะนำมาทดสอบต่อโดยวิธีการ MTT bioassay ต่อไป

6. ทำการเตรียม Complete RPMI-1640 มาตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพก่อนนำมาใช้งานในครั้งต่อไป ตามขั้นตอนในข้อ ฉ 4. ของหัวข้อ 3.6.1.2

ตารางที่ 3.2 แสดงตำแหน่งของหลุมที่เติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายใน Complete RPMI-1640 ลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม โดยมี 81 หลุมที่ไม่ใช้

Cell control	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
X	X	X	X
DMSO 4%	DMSO 3%	DMSO 2%	DMSO 1%

หมายเหตุ : 1). แต่ละช่องในตารางนี้มีหลุมที่เติมสารทดสอบชนิดเดียวกันจำนวน 3 หลุม

3.6.2.3 การนำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมมาตรวจสอบหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (% Cell viability) ของเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

1. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5% ออกมาจากตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C มาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง จนสารละลาย MTT ละลายหมดและมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง ทำการเตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ตาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการในข้อ ก 1. ของหัวข้อ 3.6.1.1 แต่ไม่ต้องเปิดหลอดไฟให้แสงสว่าง นำอุปกรณ์ที่ต้องใช้ทั้งหมด เข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

2. นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุม (ในข้อ 5. ของหัวข้อ 3.6.2.2) ออกมาจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ นำมาเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ พบว่าสีของสารละลายในแต่ละหลุมของถาดทดสอบนี้ เปลี่ยนจากสีชมพูเข้ม เป็นสีเหลืองใส โดยเฉพาะหลุมที่เติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 3 และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม ทำการดูดสารละลายในแต่ละหลุมทิ้งไป 100 ไมโครลิตร โดยดูดสารละลายทิ้งจากหลุมที่เป็น cell control ตามด้วยหลุมซึ่งเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย ตามลำดับ

3. ดูดสารละลาย MTT มาเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร 1 หลอดจำนวน 250 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเติมสารละลาย MTT ลงในแต่ละหลุมของถาดทดสอบนี้ โดยเติมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5% หลุมละ 15 ไมโครลิตร จากหลุมที่เป็น cell control ตามด้วยหลุมซึ่งเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย ตามลำดับ

4. ปิดฝาถาดทดสอบชนิด 96 หลุม จับถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้เคาะอย่างเบามือที่ขอบด้านหน้า-หลัง และด้านซ้าย-ขวา ด้านละ 4-5 ครั้ง เพื่อให้สารละลาย MTT ที่เติมลงไปในทุกหลุม ผสมเข้ากับสารละลายเดิมในแต่ละหลุม จากนั้นนำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้ กลับเข้าไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิมนาน 2 ชั่วโมง

5. เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้ออกมาจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ โดยจะเห็นว่าในแต่ละหลุมมีผลึกขนาดเล็กสีม่วงเกิดขึ้น ซึ่งก็คือผลึก formazan โดยในหลุมที่เป็น cell control และหลุมที่เติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย มีผลึก formazan เกิดขึ้นในปริมาณสูง ส่วนหลุมที่เติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 2 และ 3% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย มีปริมาณผลึก formazan น้อยลงไปตามลำดับ และหลุมที่เติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย มีปริมาณผลึก formazan เกิดขึ้นน้อยมาก ทำการละลายผลึก formazan ในแต่ละหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้นอกตู้ลามินาร์โฟล์ โดยเปิดฝาของถาดทดสอบ ใช้กระดาษทิชชู่พับเป็นทบ ๆ กดทับบนถาดทดสอบนี้เหนือปากหลุมทุกหลุมให้แน่น แล้วคว่ำถาดทดสอบนี้ลง เพื่อให้สารละลายในทุกหลุมของถาดทดสอบ ไหลออกมาบนกระดาษทิชชู่ที่ใช้ซับจนหมด ค่อย ๆ ดึงทบกระดาษทิชชู่ออกจากถาดทดสอบ แล้วหงายถาดทดสอบขึ้น

6. ทำการเติม DMSO เข้มข้น 99.95% ลงในทุกหลุมของถาดทดสอบนี้ หลุมละ 200 ไมโครลิตร จนครบทุกหลุม จากนั้นทำการดูด DMSO ในแต่ละหลุมขึ้น-ลง 4-5 ครั้ง เพื่อให้ DMSO ละลายผลึก formazan ได้ดี โดยให้ทำจากหลุมซึ่งเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 4% ณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นสุดท้าย ตามด้วยหลุมซึ่งเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 3, 2, และ 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย ตามลำดับ และหลุมที่เป็น cell control

7. นำถาดทดสอบชนิด96 หลุมนี้ไปทำการวัดค่าO.D.ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต 630 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่า O.D. อ้างอิง โดยใช้เครื่อง ELISA reader (Bio Kinetics Reader) จากนั้นทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละหลุมของถาดทดสอบนี้ ซึ่งมีการเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย จากสูตร

%Cell viability = (ค่า O.D. ของหลุมที่เติมสารละลายทดสอบ / ค่า O.D. ของหลุมที่เป็น cell control) x 100 ดังแสดงในตารางที่ ค-1 ของภาคผนวก ค. แล้วทำการหาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ดังแสดงในตารางที่ ง-1 ของภาคผนวก ง.

3.6.3 การทดลองตอนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวแดง ต่อเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

การทดลองนี้ประกอบด้วย การเตรียมสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, FTCMU 3385, และ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน สำหรับใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ การถ่ายเซลล์ HEK293T ลงเลี้ยงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม การเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกตัวอย่างดังกล่าวใน Complete RPMI-1640 และการเติมสารละลายดังกล่าวลงในถาดทดสอบนี้ และการวัดค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

3.6.3.1 การเตรียมสารสกัดจากข้าวแดง สำหรับใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293T

1. ชั่งตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *Monascus purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ตัวอย่างละ 1 กรัม ใส่ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร ตัวอย่างละขวด รวม 12 ขวด

2. ดูดเมทานอลเข้มข้น 99.95% มาใส่ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตรในข้อ 1. ขวดละ 8 มิลลิลิตร จากนั้นนำขวดสำหรับปรับปริมาตรทั้ง 12 ขวดนี้ไปใส่ลงในเครื่องเขย่าชนิดปรับรอบการหมุนได้ โดยตั้งรอบการหมุนอยู่ที่ 200 รอบ/นาที ณ อุณหภูมิ 37°C แล้วเปิดเดินเครื่องทำการเขย่าเพื่อให้เมทานอลสกัดข้าวแดงนาน 18 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เมื่อครบ 18 ชั่วโมง ให้ดูดสารละลายของข้าวแดง มาทำการกรองผ่านไซริงจ์แก้วขนาด 10 มิลลิลิตรที่ประกอบกับ syringe filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน ทำการบรรจุสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลซึ่งผ่านการกรองแล้ว จำนวนตัวอย่างละ 7 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 20 x 100 มิลลิเมตร

4. ทำการแบ่งสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลทั้ง 12 ตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยแบ่งสารละลายของข้าวแดงแต่ละตัวอย่างมา 3.5 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร โดยจะใช้สารละลายของตัวอย่างข้าวแดงในเมทานอลในหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้งหมด ไปใช้เตรียมสารสกัดเพื่อตรวจกับเซลล์ HEK293T สำหรับสารละลายของข้าวแดงที่เหลือของทั้ง 12 ตัวอย่าง ให้บรรจุอยู่ในหลอดทดลองตามเดิม ซึ่งจะใช้ในการตรวจหาปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC ต่อไป ใช้อะลูมิเนียมฟอยล์ห่อหลอดเซนตริฟิวจ์ และห่อหลอดทดลองทุกหลอด แล้วนำเข้าเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

5. นำสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลทุกตัวอย่างซึ่งบรรจุในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรที่ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ จากข้อ 4. ออกมาจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นำมาตั้งไว้ณ อุณหภูมิห้อง จนมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง นำสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลแต่ละตัวอย่างดังกล่าว มาทำการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 37°C โดยให้ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมขนาด 1 ลิตรแต่ละใบ ที่ใช้ระเหยแห้งสารละลายข้าวแดงในเมทานอลแต่ละตัวอย่าง ในช่วงก่อนและหลังเติมสารละลายข้าวแดงในเมทานอล และชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมดังกล่าวหลังการระเหยแห้งสารละลายข้าวแดงในเมทานอล เพื่อนำไปใช้คำนวณหาน้ำหนักแห้งของสารสกัดข้าวแดงต่อไป

6. นำขวดก้นกลมบรรจุสารละลายข้าวแดงในเมทานอล ซึ่งผ่านการระเหยแห้งแล้วทุกใบ มาเติม DMSO เข้มข้น 99.95% ขวดละ 1.5 มิลลิลิตร เพื่อให้ DMSO ละลายส่วนที่แห้งแล้วทั้งหมดของสารละลายข้าวแดง ซึ่งติดอยู่ภายในขวดก้นกลมแต่ละใบ จากนั้นดูดสารสกัดข้าวแดงใน DMSO ภายในขวดก้นกลมแต่ละใบ มาทำการกรองผ่านไซริงจ์พลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตรที่ประกอบกับ syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 1 หลอด แล้วนำหลอดเอปเพนดอร์ฟทั้ง 12 หลอดนี้ มาห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ บรรจุลงกล่อง เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.3 แสดงน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของสารสกัดข้าวแดง และความเข้มข้นของสารสกัดข้าวแดงใน DMSO

สายพันธุ์เชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ผลิตข้าวแดง และระยะหมัก	น้ำหนักขวดก้นกลม (กรัม)	น้ำหนักขวดก้นกลมที่เติมสารละลายข้าวแดง (กรัม)	น้ำหนักขวดก้นกลมหลังการระเหยแห้งแล้ว (กรัม)	น้ำหนักแห้งของสารสกัดข้าวแดง (กรัม)	ความเข้มข้นของสารสกัดข้าวแดงใน DMSO (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ATCC 16365 - 6 วัน	178.68	181.32	179.23	0.55	366.67
- 12 วัน	170.47	172.46	171.03	0.56	373.33
- 18 วัน	206.36	208.87	206.89	0.53	353.33
- 24 วัน	214.49	216.56	215.03	0.54	360.00
DMKU - 6 วัน	170.49	172.48	171.04	0.55	366.67
- 12 วัน	178.64	181.39	179.18	0.54	360.00
- 18 วัน	214.48	216.66	215.02	0.54	360.00
- 24 วัน	206.32	209.47	206.85	0.53	353.33
FTCMU 3385 - 6 วัน	170.48	172.48	171.04	0.56	373.33
- 12 วัน	178.56	180.54	179.10	0.54	360.00
- 18 วัน	214.51	216.80	215.06	0.55	366.67
- 24 วัน	206.38	208.75	206.93	0.55	366.67

3.6.3.2 การถ่ายเซลล์ HEK293T ลงเลี้ยงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

ก. การถ่ายเซลล์ HEK293T จากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปตรวจนับปริมาณเซลล์

นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 อันที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T มาตรวจสอบการเจริญของเซลล์ HEK293T พบว่าเซลล์ HEK293T มีการเจริญอยู่ที่ประมาณ 90% (90% confluence) จึงทำการถ่ายเซลล์ HEK293T จากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ มาบรรจุในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร ตามวิธีการในข้อ 1-4 ของหัวข้อ 3.6.1.3 แล้วดูด Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T มา 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อทำการตรวจนับปริมาณเซลล์ HEK293T

ข. การตรวจนับปริมาณเซลล์ HEK293T และการคำนวณหาปริมาณเซลล์และ Complete RPMI-1640 ที่จะใช้ถ่ายลงถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

1. นำหลอดเอปเพนดอร์ฟที่มีเซลล์ HEK293T ใน Complete RPMI-1640 จำนวน 100 ไมโครลิตร มาผสมกับ Trypan blue เข้มข้น 0.2% จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายที่มีเซลล์ HEK293T มาเติมลงในส่วนตรงกลางของชุดตรวจนับปริมาณเซลล์ (Hemocytometer) ซึ่งมีแผ่นสไลด์ปิดทับอยู่ โดยเติมสารละลายที่ขอบด้านบนและด้านล่างของส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรงกลางนี้ ด้านละ 10 ไมโครลิตร นำชุดตรวจนับปริมาณเซลล์ ไปนับปริมาณเซลล์ HEK293T โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงสว่างธรรมดาที่กำลังขยาย 10 เท่า

ตารางที่ 3.4 ผลการตรวจนับปริมาณเซลล์ HEK293T ในการทดลองตอนที่ 3 จากชุดตรวจนับ

ด้านบนของชุดตรวจนับปริมาณเซลล์		ด้านล่างของชุดตรวจนับปริมาณเซลล์	
เซลล์ที่มีชีวิตอยู่	เซลล์ที่ตายแล้ว	เซลล์ที่มีชีวิตอยู่	เซลล์ที่ตายแล้ว
495	24	448	11
500	37	555	14
488	34	449	18
489	31	413	19
รวม 1,972	รวม 126	รวม 1,865	รวม 62

2. ทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีอยู่ของเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตทั้งหมด (% Cell viability), ปริมาณเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต / ไมโครลิตรของ Complete RPMI-1640, ปริมาณเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตทั้งหมดใน Complete RPMI-1640 ภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรจากข้อ ก. คำนวณหาปริมาณ Complete RPMI-1640 และเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต ซึ่งจะใช้ถ่ายลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมจำนวน 1 ถาด และปริมาณ Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตจากหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรจากข้อ ก. ที่ต้องนำมาใช้ถ่ายลงถาดทดสอบชนิด 96 หลุมจำนวน 1 ถาด ตามวิธีการในข้อ ข 3.-ข 6. ของหัวข้อ 3.6.2.1 ได้ 95.32%, 9,592.5 เซลล์/ไมโครลิตร, 1.44 x10^7เซลล์, 10 มิลลิลิตร, 5 x10^5เซลล์, 52.4 ไมโครลิตร ตามลำดับ

ค. การเตรียม Complete RPMI-1640 ซึ่งมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิต ถ่ายลงถาดทดสอบชนิด 96 หลุม และการแบ่งเซลล์ HEK293T ที่เหลือลงเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 อัน

1. ดูด Complete RPMI-1640 จำนวน 10 มิลลิลิตรมาเติมลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วดูด Complete RPMI-1640 นี้ทิ้งไป 52.4 ไมโครลิตร จากนั้นทำการดูดเซลล์ HEK293T ที่อยู่ใน Complete RPMI-1640 จำนวน 1,500 ไมโครลิตรจากข้อ ก จำนวน 52.4 ไมโครลิตรเติมลงไปแทนทำการผสมให้เข้ากัน โดยการดูดขึ้น-ลง 3-4 ครั้ง

2. ดูด Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T จากหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรในข้อ ค 1. มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ครบทุกหลุม ปิดฝาถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ทำการแบ่งบริเวณของหลุมที่จะใช้เติมสารละลายทดสอบ ในวันรุ่งขึ้นบนฝาถาด ดังตารางที่ 3.5

3. ให้ปฏิบัติอย่างเดียวกันตามวิธีการในข้อ ค 1. และ ค 2. ในการเตรียม Complete RPMI-1640 ที่มีเซลล์ HEK293T มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 2 และ 3 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จนครบทุกหลุม โดยให้ถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 1 เป็นของชุดการทดสอบสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ถาดที่ 2 เป็นของชุดการทดสอบสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 และถาดที่ 3 เป็นของชุดการทดสอบสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU และสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน DMSO ทำการแบ่งบริเวณของหลุมที่จะใช้เติมสารละลายทดสอบในวันรุ่งขึ้น ดังตารางที่ 3.6 และ 3.7

4. นำถาดทดสอบทั้ง 3 ถาดนี้ไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับตามวิธีการในข้อ ค 3. ของหัวข้อ 3.6.2.1 เมื่อพบว่าเซลล์ HEK293T ภายในแต่ละหลุมของถาดทดสอบแต่ละถาด มีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอดีแล้ว ให้นำถาดทดสอบทั้ง 3 ถาดนี้เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ทำการล้างภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันด้วย Incomplete RPMI-1640 ดูดทิ้ง แล้วทำการ subculture เซลล์ HEK293T ใน Complete RPMI-1640 ที่เหลือภายในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อ ค 1. ลงเพาะเลี้ยงต่อในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์สองอัน ตามวิธีการในข้อ ค 4. และ ค 5. ของหัวข้อ 3.6.2.1 แล้วจึงนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองอันนี้เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% นาน 96 ชั่วโมง

6. นำเซลล์ HEK293T ที่เหลืออยู่มาทำการแช่แข็งเพื่อเก็บรักษาไว้ และทำการเตรียม Complete RPMI-1640 และ Incomplete RPMI-1640 มาตรวจสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพ ก่อนนำมาใช้งานในครั้งต่อไป ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนเหมือนกับในข้อ ฉ 1.-ฉ 4. ของหัวข้อ 3.6.1.2

3.6.3.3 การเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง, สารละลาย DMSO, และสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ใน Complete RPMI-1640 และการนำสารละลายดังกล่าวมาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมที่เตรียมขึ้น

ก. การเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง, สารละลาย DMSO, และสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ใน Complete RPMI-1640

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. เตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 10,000 ppm ใน DMSO โดยชั่งซิตรินินมาตรฐานจำนวน 0.001 กรัม เติมลงในขวดไวเอิลขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม DMSO เข้มข้น 99.95% จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ทำการเตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ ตามวิธีการในข้อ ก 1. ของหัวข้อ 3.6.1.1 แต่ไม่ต้องเปิดหลอดไฟให้แสงสว่าง นำวัสดุอุปกรณ์ที่จะใช้ทั้งหมดเข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ และนำขวดบรรจุ Complete RPMI-1640 ออกมาจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นำมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37°C นาน 15 นาที แล้วนำเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

3. นำหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่บรรจุสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน DMSO จากข้อ 6. ของหัวข้อ 3.6.3.1 ออกมาจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นำมาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง จนมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง แล้วนำเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

4. นำหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตรออกมาเตรียมไว้ 3 ชุด ชุดละ 22 หลอด จัดเรียงหลอดเอปเพนดอร์ฟทั้ง 3 ชุดนี้เป็น 4 แถว ๆ ละ 5 หลอด และ 2 หลอดสุดท้ายของแต่ละชุด ให้อยู่ท้ายแถวที่ 1 และแถวที่ 4 จากนั้นดูด Complete RPMI-1640 มาเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดแรกของทั้ง 4 แถวในทั้ง 3 ชุด หลอดละ 700 ไมโครลิตร และเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 2 ของทั้ง 4 แถวในทั้ง 3 ชุดหลอดละ 350 ไมโครลิตร ดูด Complete RPMI-1640 มาเติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร 2 หลอด โดยเติมในหลอดที่ 1 จำนวน 15,750 ไมโครลิตร และเติมในหลอดที่ 2 จำนวน 1,050 ไมโครลิตร

5. ทำการเตรียม Complete RPMI-1640 ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรหลอดที่ 1 และ 2 ในข้อ ก 4. ให้มี DMSO เข้มข้น 1 และ 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายตามลำดับ เมื่อเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม โดยดูด Complete RPMI-1640 ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่ 1 และ 2 นี้ทิ้งไป 315 และ 42 ไมโครลิตร แล้วเติม DMSO เข้มข้น 99.95% จำนวน 315 และ 42 ไมโครลิตรลงไปแทนตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้น-ลง 5-6 ครั้ง แล้วดูดสารละลาย DMSO เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายจากหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดที่ 1 มาเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 3-5 ในทุกแถว และหลอดที่ 6 ในแถวที่ 4 ของทั้ง 3 ชุด หลอดละ 350 ไมโครลิตร และดูดสารละลาย DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายจากหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดที่ 2 มาเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 6 ในแถวที่ 1 ของทั้ง 3 ชุด หลอดละ 350 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ทำการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640 ในหลอดเอปเพนดอร์ฟชุดที่ 1 ดังนี้

6.1 ภายในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1 ของทุกแถว จะกำหนดให้มี DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย และกำหนดให้หลอดเอปเพนดอร์ฟในแถวที่ 1, 2, 3, 4 เป็นของชุดทดสอบที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ตามลำดับ ให้ดูด Complete RPMI-1640 ในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1 ของแถวที่ 1 ซึ่งมีอยู่ 700 ไมโครลิตร ทิ้งไป 28 ไมโครลิตร แล้วเติมสารสกัดของข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6 วันใน DMSO ลงไปแทน 28 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้น-ลง 6 ครั้ง แล้วดูดสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1 มา 350 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 2 ในแถวเดียวกัน ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้น-ลง 6 ครั้ง แล้วทำการเจือจางลงทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) อย่างต่อเนื่องในลักษณะเดียวกัน จนถึงหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 5 ในแถวเดียวกัน สำหรับหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 6 ในแถวเดียวกันนี้ (จากข้อ ก 5.) จะใช้เป็นสารละลาย DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย โดยไม่มีสารสกัดข้าวแดง (vehicle control : DMSO 2%)

6.2 ให้ปฏิบัติอย่างเดียวกัน ตามวิธีการในข้อ ก 6.1 สำหรับการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 12, 18, และ 24 วัน ภายในหลอดเอปเพนดอร์ฟแถวที่ 2, 3, และ 4 ตามลำดับ ส่วนหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 6 ในแถวที่ 4 (จากข้อ ก 5.) จะใช้เป็นสารละลาย DMSO เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย โดยไม่มีสารสกัดข้าวแดง (vehicle control : DMSO 1%)

7. ทำการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 และ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640 ภายในหลอดเอปเพนดอร์ฟชุดที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ตามวิธีการในข้อ ก 6.1 และ ก 6.2

8. ทำการเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 โดยนำหลอดหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตรออกมาเตรียมไว้ 6 หลอด ดูด Complete RPMI-1640 มาเติมในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1 จำนวน 700 ไมโครลิตร ส่วนหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 2-6 ให้เติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย จากหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรหลอดที่ 1 (ในข้อ ก 5.) หลอดเอปเพนดอร์ฟละ 350 ไมโครลิตร

9. ให้ดูด Complete RPMI-1640 ในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1 ซึ่งมีอยู่ 700 ไมโครลิตร ทิ้งไป 14 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 10,000 ppm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใน DMSO (จากข้อ ก 1.) ลงไปแทน 14 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้น-ลง 6 ครั้ง แล้วดูดสารละลายของซิตรินินมาตรฐานในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1 มา 350 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้น-ลง 6 ครั้ง แล้วทำการเจือจางลงทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) อย่างต่อเนื่องในลักษณะเดียวกัน จนถึงหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 6 สำหรับการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกตัวอย่าง และสารละลายซิตรินินมาตรฐานในช่วงก่อนและหลังเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ได้แสดงไว้ในหัวข้อ 3. และ 4. ของภาคผนวก ข.

ข. การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง, สารละลาย DMSO, และสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ใน Complete RPMI-1640 ลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมที่เตรียมขึ้น

1. นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมทั้ง 3 ถาดในข้อ ค 4. ของหัวข้อ 3.6.3.2 ออกมาจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ นำเข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ทำการดูดสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน จากหลอดเอปเพนดอร์ฟชุดที่ 1 (ในข้อ ก 6.) ลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมถาดที่ 1 ก่อนโดย

1.1 ดูดสารละลาย DMSO เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย (vehicle control : DMSO 1%) จากหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 6 ในแถวที่ 4 (ในข้อ ก 6.2) มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมถาดที่ 1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จนครบ 3 หลุมตามตารางที่ 3.5 แล้วทำการดูดสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6 วัน ซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย ภายในแถวที่ 1 (ในข้อ ก 6.1) มาเติมลงในถาดทดสอบนี้ จากหลอดเอปเพนดอร์ฟที่มีความเข้มข้นของ สารสกัดข้าวแดงต่ำสุด (หลอดที่ 5) ขึ้นไปหาหลอดเอปเพนดอร์ฟที่มีความเข้มข้นของสารสกัดข้าวแดงตัวอย่างเดียวกันสูงกว่าตามลำดับ จนถึงหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของสารสกัดข้าวแดงตัวอย่างเดียวกันนี้สูงสุด และมี DMSO 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย (ในข้อ ก 6.1) จนครบทุกหลอด โดยเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงนี้ หลอดเอปเพนดอร์ฟละ 3 หลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ตามตารางที่ 3.5

1.2 ทำการดูดสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 12, 18, และ 24 วัน จากหลอดเอปเพนดอร์ฟในแถวที่ 2, 3, และ 4 ของชุดที่ 1 (ในข้อ ก 6.2) มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมถาดเดียวกันนี้ โดยวิธีการเดียวกันกับข้อ ข 1.1 จนครบทุกหลุมตามตารางที่ 3.5

1.3 ทำการดูด Complete RPMI-1640 มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมเดียวกันนี้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร จนครบ 6 หลุมตามตารางที่ 3.5 โดยทั้ง 6 หลุมนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะใช้เป็น cell control และดูดสารละลาย DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย (vehicle control : DMSO 2%) จากหลอดเอปเพนดอร์ฟหลอดที่ 6 ของแถวที่ 1 (ในข้อ ก 6.1) มาเติมลงในถาดทดสอบนี้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร จนครบ 3 หลุมตามตารางที่ 3.5

2. ทำการดูดสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 และ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน จากหลอดเอปเพนดอร์ฟในแถวที่ 1, 2, 3, และ 4 ของชุดที่ 2 และ 3 (ในข้อ ก 7.) มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมถาดที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยวิธีการในข้อ ข 1.1 – ข 1.3 จนครบทุกหลุมตามตารางที่ 3.6 และ 3.7

3. ทำการดูดสารละลายซิตรินินมาตรฐานซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายในข้อ ก 9. มาเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมถาดที่ 3 จากหลอดเอปเพนดอร์ฟที่มีความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานต่ำสุด ขึ้นไปหาหลอดเอปเพนดอร์ฟที่มีความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานสูงกว่า ตามลำดับ จนครบทั้ง 6 หลอด หลอดละ 3 หลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ตามตารางที่ 3.7 สำหรับความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง และสารละลายซิตรินินมาตรฐาน แสดงไว้ในตารางที่ 3.8 และ 3.9

4. จากนั้นจับถาดทดสอบชนิด 96 หลุมแต่ละถาด เคาะอย่างเบามือที่ขอบด้านหน้า-หลัง และด้านซ้าย-ขวา ด้านละ 4-5 ครั้ง เพื่อให้สารละลายทดสอบที่เติมลงไปในทุกหลุมผสมเข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมในแต่ละหลุม จากนั้นนำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมทั้ง 3 ถาด ดังกล่าว กลับเข้าไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิม นาน 72 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาทดสอบต่อโดยวิธีการ MTT bioassay ต่อไป

5. นำ Complete RPMI-1640 มาเตรียมตรวจความปลอดจากเชื้อจุลชีพตามวิธีการในข้อ 6. ของหัวข้อ 3.6.2.2 ก่อนนำไปใช้งานในครั้งต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.5 แสดงตำแหน่งของหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน สารละลาย DMSO เข้มข้น 1 และ 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายใน Complete RPMI-1640 (vehicle control : DMSO 1 และ 2%) ภายในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 1 โดยมี 24 หลุมที่ไม่ใช้

1	ATCC 6	ATCC 12	ATCC 18	ATCC 24
2	(7.33, DMSO 2%)	(7.47, DMSO 2%)	(7.06, DMSO 2%)	(7.20, DMSO 2%)
3	(3.67, DMSO 1%)	(3.74, DMSO 1%)	(3.53, DMSO 1%)	(3.60, DMSO 1%)
4	(1.84, DMSO 1%)	(1.87, DMSO 1%)	(1.77, DMSO 1%)	(1.80, DMSO 1%)
5	(0.92, DMSO 1%)	(0.94, DMSO 1%)	(0.89, DMSO 1%)	(0.90, DMSO 1%)
6	(0.46, DMSO 1%)	(0.47, DMSO 1%)	(0.45, DMSO 1%)	(0.45, DMSO 1%)
7	X	X	X	X
8	X	Vehicle control : DMSO 2%	Vehicle control : DMSO 1%	X
9	X	Cell control	Cell control	X

หมายเหตุ : 1). แต่ละช่องในตารางนี้ตั้งแต่แถวที่ 2 ลงมามีหลุมที่เติมสารทดสอบชนิดเดียวกันจำนวน 3 หลุม

2). ตัวเลขด้านหน้าภายในวงเล็บ คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (หน่วยเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนข้อความด้านหลังภายในวงเล็บ คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSOที่มีอยู่ในสารละลายของสารสกัดข้าวแดง

ตารางที่ 3.6 แสดงตำแหน่งของหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน สารละลาย DMSO เข้มข้น 1 และ 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายใน Complete RPMI-1640 (vehicle control : DMSO 1 และ 2%) ภายในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 2 โดยมี 24 หลุมที่ไม่ใช้

1	FTCMU 6	FTCMU 12	FTCMU 18	FTCMU 24
2	(7.47, DMSO 2%)	(7.20, DMSO 2%)	(7.33, DMSO 2%)	(7.33, DMSO 2%)
3	(3.74, DMSO 1%)	(3.60, DMSO 1%)	(3.67, DMSO 1%)	(3.67, DMSO 1%)
4	(1.87, DMSO 1%)	(1.80, DMSO 1%)	(1.84, DMSO 1%)	(1.84, DMSO 1%)
5	(0.94, DMSO 1%)	(0.90, DMSO 1%)	(0.92, DMSO 1%)	(0.92, DMSO 1%)
6	(0.47, DMSO 1%)	(0.45, DMSO 1%)	(0.46, DMSO 1%)	(0.46, DMSO 1%)
7	X	X	X	X
8	X	Vehicle control : DMSO 2%	Vehicle control : DMSO 1%	X
9	X	Cell control	Cell control	X

หมายเหตุ : 1). แต่ละช่องในตารางนี้ตั้งแต่แถวที่ 2 ลงมามีหลุมที่เติมสารทดสอบชนิดเดียวกันจำนวน 3 หลุม

2). ตัวเลขด้านหน้าภายในวงเล็บ คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (หน่วยเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนข้อความด้านหลังภายในวงเล็บ คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ที่มีอยู่ในสารละลายของสารสกัดข้าวแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.7 แสดงตำแหน่งของหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน สารละลาย DMSO เข้มข้น 1 และ 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย (vehicle control : DMSO 1 และ 2%) และสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ภายในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 3 โดยมี 6 หลุมที่ไม่ใช้

1	DMKU 6	DMKU 12	DMKU 18	DMKU 24
2	(7.33, DMSO 2%)	(7.20, DMSO 2%)	(7.33, DMSO 2%)	(7.33, DMSO 2%)
3	(3.67, DMSO 1%)	(3.60, DMSO 1%)	(3.67, DMSO 1%)	(3.67, DMSO 1%)
4	(1.84, DMSO 1%)	(1.80, DMSO 1%)	(1.84, DMSO 1%)	(1.84, DMSO 1%)
5	(0.92, DMSO 1%)	(0.90, DMSO 1%)	(0.92, DMSO 1%)	(0.92, DMSO 1%)
6	(0.46, DMSO 1%)	(0.45, DMSO 1%)	(0.46, DMSO 1%)	(0.46, DMSO 1%)
7	X	Vehicle control : DMSO 1%	Std CTN (3.125)	Std CTN (6.25)
8	Std CTN (100)	Std CTN (50)	Std CTN (25)	Std CTN (12.5)
9	X	Vehicle control : DMSO 2%	Cell control	Cell control

หมายเหตุ : 1). แต่ละช่องในตารางนี้ตั้งแต่แถวที่ 2 ลงมามีหลุมที่เติมสารทดสอบชนิดเดียวกันจำนวน 3 หลุม

2). ตัวเลขด้านหน้าภายในวงเล็บ คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (หน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนข้อความด้านหลังภายในวงเล็บ คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSOที่มีอยู่ในสารละลายของสารสกัดข้าวแดง

3). สำหรับตัวเลขในวงเล็บของชุดทดสอบสารละลายซิตรินินมาตรฐาน คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายซิตรินินมาตรฐาน (หน่วยเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในสารละลายเท่ากับ 1%

3.6.3.4 การนำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมมาตรวจสอบหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (% Cell viability) ของเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

1. ทำการเตรียมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5% ให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน ทำการเตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ และนำอุปกรณ์ที่ต้องใช้เข้ามาในตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อตามวิธีการในข้อ 1. ของหัวข้อ 3.6.2.3

2. นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 1, 2, และ 3 (ในข้อ ข 4. ของหัวข้อ 3.6.3.3) ออกมาจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ นำมาเข้าตู้ลามินาร์โฟล์ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ตรวจสอบดูสีของสารละลายในแต่ละหลุมภายในถาดทดสอบทุกถาด พบว่าสีของสารละลายในแต่ละหลุมของทุกถาดเปลี่ยนแปลงไป จากสีชมพูเข้มในวันที่เติมสารละลายทดสอบ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเฉพาะทุกหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทุกสายพันธุ์ ที่ทุกระยะหมัก ซึ่งมี DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย มีความเข้มข้นของสารสกัดข้าวแดงสูงมาก มีสีเหลืองเข้มเกือบเป็นสีส้ม ทำการดูดสารละลายภายในแต่ละหลุมของถาดที่ 1 ทิ้งไป 100 ไมโครลิตร โดยดูดสารละลายทิ้งจากหลุมที่เป็น cell control หลุมที่เป็น vehicle control : DMSO 1 และ 2%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามด้วยหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 จากหลุมซึ่งมีความเข้มข้นต่ำสุด ขึ้นไปหาหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นไปตามลำดับ ทั้งนี้ให้ดูดสารละลายทิ้งจากทุกหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6 วันก่อน แล้วตามด้วยที่ระยะหมัก 12, 18, และ 24 วันตามลำดับ

2.1 ให้ทำการดูดสารละลายในแต่ละหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นของชุดทดสอบสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 และ DMKU ทิ้งไป โดยวิธีการเดียวกันกับการดูดสารละลายในแต่ละหลุมของถาดที่ 1 ในข้อ 2. ทิ้งไป ทั้งนี้ให้ทำทีละถาด สำหรับหลุมซึ่งเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ในถาดที่ 3 นี้ ให้ทำการดูดสารละลายในแต่ละหลุมทิ้งไป 100 ไมโครลิตร ในลักษณะเดียวกันกับ การดูดสารละลายจากหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทิ้งไป

3. ดูดสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5% มาเติมลงในหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตรจำนวน 1,500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเติมสารละลาย MTT นี้ลงในแต่ละหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุมถาดที่ 1 โดยเติมสารละลาย MTT หลุมละ 15 ไมโครลิตร ให้เติมสารละลาย MTT จากหลุมที่เป็น cell control หลุมที่เป็น vehicle control : DMSO 1 และ 2% ตามด้วยหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด ขึ้นไปหาหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงตัวอย่างเดียวกัน ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นไปตามลำดับ ทั้งนี้ให้เติมสารละลาย MTT ในทุกหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 วันก่อน แล้วตามด้วยที่ระยะหมัก 12, 18, และ 24 วันตามลำดับ ปิดฝาถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 1 จับถาดทดสอบนี้เคาะอย่างเบามือที่ขอบด้านหน้า-หลัง และด้านซ้าย-ขวา ด้านละ 4-5 ครั้ง เพื่อให้สารละลาย MTT ที่เติมลงไปในทุกหลุม ผสมเข้ากับสารละลายเดิมในแต่ละหลุม จากนั้นนำถาดทดสอบนี้ กลับเข้าไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเดิมนาน 2 ชั่วโมง

3.1 ให้ทำการเติมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5% ลงในแต่ละหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นของชุดทดสอบสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 และ DMKU โดยวิธีการเดียวกันกับการเติมสารละลาย MTT ลงในแต่ละหลุมของถาดที่ 1 ในข้อ 3.ทั้งนี้ให้ทำทีละถาด สำหรับหลุมซึ่งเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานในถาดที่ 3 นี้ ให้ทำการเติมสารละลาย MTT ในแต่ละหลุม ในลักษณะเดียวกันกับการเติมสารละลาย MTT ลงในแต่ละหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงในข้อ 3.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เมื่อครบ 2 ชั่วโมงนำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมทั้ง 3 ถาด ออกมาจากตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ตรวจดูสภาพในแต่ละหลุม พบว่าทุกหลุมที่เติมสารละลาย MTT มีสีเหลือง โดยในทุกหลุมที่เป็น cell control, vehicle control : DMSO 1%, และทุกหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง หรือสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำ มีผลึก formazan อยู่ในปริมาณสูง ส่วนหลุมที่เป็น vehicle control : DMSO 2% มีปริมาณผลึก formazan น้อยกว่าสำหรับทุกหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง หรือสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นสูง ๆ มีปริมาณผลึก formazan น้อยลงตามลำดับ ทำการละลายผลึกสีม่วง ในแต่ละหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุม นอกตู้ลามินาร์โฟล์ โดยทำการคว่ำถาดทดสอบทั้งสามถาดนี้ ทีละถาดตามวิธีการในข้อ 5. ของหัวข้อ 3.6.2.3

5. ทำการเติม DMSO เข้มข้น 99.95% ลงในทุกหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 1 หลุมละ 200 ไมโครลิตร จนครบทุกหลุม จากนั้นทำการดูด DMSO ในแต่ละหลุมขึ้น-ลง 4-5 ครั้ง เพื่อให้ DMSO ละลายผลึกสีม่วงได้ดี โดยให้ทำจากหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ซึ่งมีความเข้มข้นสูงสุด มาหาหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงตัวอย่างเดียวกัน ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำกว่าตามลำดับ และหลุมที่เป็น vehicle control : DMSO 2 และ 1% ตามลำดับ ทั้งนี้ให้ทำการดูด DMSO ในทุกหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 วันก่อน แล้วจึงดูด DMSO ในทุกหลุมซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12, 18, และ 24 วันตามลำดับ สุดท้ายจึงทำการดูด DMSO ในแต่ละหลุมที่เป็น cell control ขึ้น-ลง 4-5 ครั้ง

6. ทำการเติม DMSO เข้มข้น 99.95% ลงในทุกหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นของชุดทดสอบสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 และ DMKU แล้วทำการละลายผลึก formazan โดยวิธีการเดียวกันกับการละลายผลึก formazan ในแต่ละหลุมของถาดที่ 1 ในข้อ 5. ทั้งนี้ให้ทำทีละถาด สำหรับหลุมซึ่งเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานในถาดที่ 3 นี้ ให้ทำการละลายผลึก formazan ในแต่ละหลุม โดยวิธีการเดียวกันกับการละลายผลึก formazan ในหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงในข้อ 5.

7. นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ถาดที่ 1, 2, และ 3 นี้ ไปทำการวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต 630 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่า O.D. อ้างอิง โดยใช้เครื่อง ELISA reader (Bio Kinetics Reader)

8. ทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละหลุมของถาดทดสอบทั้ง 3 ถาดนี้ ซึ่งเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ซึ่งมีความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายซิตรินินมาตรฐานซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย จากสูตร

%Cell viability = (ค่า O.D. ของหลุมที่เติมสารละลายทดสอบ / ค่า O.D. ของหลุมที่เป็น vehicle control : DMSO 1%) x 100 เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ที่เกิดจากอิทธิพลของสารสกัดข้าวแดง หรือซิตรินินมาตรฐานจริง ๆ โดยตัดอิทธิพลที่เกิดจากตัวทำละลาย DMSO ในสารสกัดข้าวแดง หรือสารละลายซิตรินินมาตรฐานออกไป ดังแสดงในตารางที่ ค-2 และ ค-3 ของภาคผนวก ค.

9. ทำการหาค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายดังกล่าวนี้ และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายดังกล่าวนี้ ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ตลอดจนวิเคราะห์ความแปรปรวน และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายดังกล่าวนี้ และค่าความเข้มข้นของสารละลายดังกล่าวนี้ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ดังแสดงในตารางที่ ง-1 และ ง-2 ของภาคผนวก ง.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.8 แสดงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 (มี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย) ในช่วงก่อนและหลังการเติมสารละลายดังกล่าวลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

สายพันธุ์เชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ผลิตข้าวแดงและระยะหมัก	ความเข้มข้นของสารสกัดข้าวแดงใน DMSO (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ก่อนเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม				ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หลังจากเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม			
		ความเข้มข้นที่ 1 (สูงสุด)	ความเข้มข้นที่ 2	ความเข้มข้นที่ 3	ความเข้มข้นที่ 4 (ต่ำสุด)	ความเข้มข้นที่ 1 (สูงสุด)	ความเข้มข้นที่ 2	ความเข้มข้นที่ 3	ความเข้มข้นที่ 4 (ต่ำสุด)
ATCC 16365									
6 วัน	366.67	7.33	3.67	1.84	0.92	3.67	1.84	0.92	0.46
12 วัน	373.33	7.47	3.74	1.87	0.94	3.74	1.87	0.94	0.47
18 วัน	353.33	7.06	3.53	1.77	0.89	3.53	1.77	0.89	0.45
24 วัน	360.00	7.20	3.60	1.80	0.90	3.60	1.80	0.90	0.45
DMKU									
6 วัน	366.67	7.33	3.67	1.84	0.92	3.67	1.84	0.92	0.46
12 วัน	360.00	7.20	3.60	1.80	0.90	3.60	1.80	0.90	0.45
18 วัน	360.00	7.20	3.60	1.80	0.90	3.60	1.80	0.90	0.45
24 วัน	353.33	7.06	3.53	1.77	0.89	3.53	1.77	0.89	0.45
FTCMU 3385									
6 วัน	373.33	7.47	3.74	1.87	0.94	3.74	1.87	0.94	0.47
12 วัน	360.00	7.20	3.60	1.80	0.90	3.60	1.80	0.90	0.45
18 วัน	366.67	7.33	3.67	1.84	0.92	3.67	1.84	0.92	0.46
24 วัน	366.67	7.33	3.67	1.84	0.92	3.67	1.84	0.92	0.46

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.9 แสดงความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 (มี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย) ในช่วงก่อนและหลังการเติมสารละลายดังกล่าวลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

ความเข้มข้น	ความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ก่อนเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐาน หลังจากเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
ความเข้มข้นที่ 1 (สูงสุด)	200	100
ความเข้มข้นที่ 2	100	50
ความเข้มข้นที่ 3	50	25
ความเข้มข้นที่ 4	25	12.5
ความเข้มข้นที่ 5	12.5	6.25
ความเข้มข้นที่ 6 (ต่ำสุด)	6.25	3.125

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.4 การทดลองตอนที่ 4 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดงด้วยวิธีการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การทดลองนี้ประกอบด้วย การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ การเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ การเตรียมสารสกัดจากข้าวแดงที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุม เพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC และการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดงด้วยวิธีการ (HPLC)

3.6.4.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

1. ทำการเตรียมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล โดยเติมน้ำปลอดอิออน 200 มิลลิลิตร ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดออร์โธฟอสฟอริกเข้มข้น 85% ตามลงไปในจำนวน 5.62 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำปลอดอิออน ทำการผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วถ่ายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล ที่ได้นี้ลงในขวดแก้วทนความร้อน (Schott duran) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

2. เติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล จำนวน 550 มิลลิลิตร อะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 99.95% จำนวน 350 มิลลิลิตร และไอโซโพรพานอลเข้มข้น 99.99% จำนวน 100 มิลลิลิตร ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันได้เป็นเฟสเคลื่อนที่

3. ทำการกรองเฟสเคลื่อนที่ที่ได้ด้วยชุดกรองสุญญากาศ โดยใช้แผ่นเยื่อกรองที่ทำจากเซลลูโลสอะซิเตต แล้วทำการถ่ายเฟสเคลื่อนที่นี้ ลงเก็บในขวดแก้วทนความร้อนขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3.6.4.2 การเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ

1. ทำการเตรียม สารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1,000 ppmในอะซิโตไนไตรล์ไว้เป็น stock solution โดยชั่งซิตรินินมาตรฐานจำนวน 0.0020 กรัม บรรจุลงในขวดแก้วสีชา (Amber glass vial) ขนาด 8 มิลลิลิตร แล้วเติมอะซิโตไนไตรล์ เข้มข้น 99.95% จำนวน 2 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน

2. ทำการเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ppm ในอะซิโตไนไตรล์ โดยดูดสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1,000 ppmในอะซิโตไนไตรล์จำนวน 500 ไมโครลิตร เติมลงในขวดแก้วสีชาขนาด 8 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 99.95% จนครบ 5 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน

3. ทำการเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 20 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ โดยดูดสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ppm ในอะซิโตไนไตรล์จำนวน 1,000 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เติมลงไปในขวดแก้วสีชาขนาด 8 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยเฟสเคลื่อนที่จนครบ 5 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน

4. ทำการเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 5, 4, 3, 2, และ 1 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ โดยดูดสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 20 ppm ในเฟสเคลื่อนที่จำนวน 1,250, 1,000, 750, 500, และ 250 ไมโครลิตร มาเติมลงในขวดแก้วสีชาขนาด 8 มิลลิลิตร อย่างละขวด ทำการปรับปริมาตรสารละลายในแต่ละขวดด้วยเฟสเคลื่อนที่จนครบ 5 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมสารละลายทั้งหมดในแต่ละขวดให้เข้ากัน ก็จะได้สารละลายในขวดแก้วสีชาแต่ละขวดเป็นสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 5, 4, 3, 2, และ 1 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ตามลำดับ แล้วเก็บขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่ในข้อ 3. ของหัวข้อ 3.6.4.1 และขวดบรรจุสารละลายซิตรินินมาตรฐานทุกความเข้มข้นดังกล่าวนี้ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

3.6.4.3 การเตรียมสารสกัดจากข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุม (blank) เพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC

1. ชั่งตัวอย่างข้าวสุกแห้งบดละเอียดที่ไม่ได้หมักกับเชื้อรา *M. purpureus* สำหรับใช้เป็นชุดทดสอบควบคุม (blank) จำนวน 1 กรัม 2 ตัวอย่าง ใส่ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 มิลลิลิตรตัวอย่างละขวด ขวดหนึ่งปรับปริมาตรให้ครบ 8 มิลลิลิตรด้วยเมทานอลเข้มข้น 99.95% ส่วนอีกขวดหนึ่งให้เติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ppm ในอะซิโตไนไตรล์จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 8 มิลลิลิตรด้วยเมทานอลเข้มข้น 99.95% เพื่อใช้เป็นชุดทดสอบควบคุม และชุดทดสอบควบคุมที่มีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm ตามลำดับ ซึ่งจะใช้ชุดทดสอบควบคุมชุดที่สองนี้ เป็นตัวเปรียบเทียบหาค่าความถูกต้องของปริมาณซิตรินิน ที่ได้จากการตรวจ HPLC

2. นำขวดสำหรับปรับปริมาตรที่บรรจุตัวอย่างข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม และชุดทดสอบควบคุมที่มีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm ไปใส่ลงในเครื่องเขย่าชนิดปรับรอบการหมุนได้ โดยตั้งรอบการหมุนอยู่ที่ 200 รอบ/นาที ณ อุณหภูมิ 37°C แล้วเปิดเดินเครื่อง ทำการเขย่าเพื่อให้เมทานอลสกัดตัวอย่างข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมทั้งสองนี้นาน 18 ชั่วโมง

3. เมื่อครบ 18 ชั่วโมง ให้นำสารละลายของตัวอย่างข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม และชุดทดสอบควบคุมที่มีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm มาทำการกรองผ่านไซริงจ์แก้วขนาด 10 มิลลิลิตรที่ประกอบกับ syringe filter ซึ่งมีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน แล้วบรรจุสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมทั้งสองตัวอย่างนี้ในเมทานอล จำนวนตัวอย่างละ 7 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 x 100 มิลลิเมตร ใช้อะลูมิเนียมฟอยล์ห่อหลอดทดลองทั้งสองหลอดนี้ แล้วนำเข้าเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.4.4 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดงด้วยวิธีการ HPLC

ก. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่อง HPLC (P680 HPLC pump, UVD 340U detector, AIS-100 Automated Sample Injector, Dionex, Germany)
- HPLC Column (3.9 x 150 mm, spherical, รุ่น W32121M 129, ยี่ห้อ Water Nova Pack C18, Waters, Ireland)

ข. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารซิตรินินสำหรับวิเคราะห์

1. ให้นำขวดแก้วสีชาซึ่งบรรจุสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm ในเฟสเคลื่อนที่จากข้อ 4. ของหัวข้อ 3.6.4.2 ออกจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C มาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง จนมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง

2. นำสารละลายซิตรินินมาตรฐานทั้ง 5 ความเข้มข้นในเฟสเคลื่อนที่นี้ ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC (ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร) เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) และจัดทำกราฟมาตรฐานสำหรับการหาความเข้มข้นของสารซิตรินิน ดังแสดงในตารางที่ 4.4.1 และภาพที่ 4.4.1 ของหัวข้อ 4.4.2 ในบทที่ 4

เมื่อได้กราฟมาตรฐานของสารซิตรินินดังกล่าวแล้ว ให้นำสารละลายของตัวอย่างข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล และชุดทดสอบควบคุมที่มีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm จากข้อ 3. ในหัวข้อ 3.6.4.3 และสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลทุกตัวอย่าง ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองจากข้อ 6. ในหัวข้อ 3.6.3.1 มาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องจนมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง แล้วทำการฉีดเข้าเครื่อง HPLC (ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร) ซึ่งแสดงรายละเอียดวิธีการไว้ในหัวข้อ 2 ของภาคผนวก ช

ค. สภาวะของการวิเคราะห์

- Flow rate 1.0 mL/min
- Mobile phase A : 55% water (H_3PO_4, pH 2.5) : 35% acetonitrile : 10% 2-propanol, อุณหภูมิห้อง
  B : 100% acetonitrile, อุณหภูมิห้อง
- Gradient : 0-4 min (100% mobile phase A), 4-12 min (50% mobile phase A / 50% mobile phase B), 12-15 min (100% mobile phase A)
- Run time 3 min
- U.V. detection at 340 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved