บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร (Bio STAT B, B.Braun Biotech international, Germany)

1.2 ถังหมักขนาด 10 ลิตร (Bio flo IV, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., INC.U.S.A.)

1.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) (spectronic 20+)

1.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ ยูวี (UV spectophotometry, BECKMAN DU 600)

1.5 เครื่องเขย่าฟลาสก์ (reciprocal shaker) (C25KC, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., INC.U.S.A.)

1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) สำหรับ (MSB010.CX2.5, co., Ltd)

1.7 เครื่องอิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) (Mupid-ex Advance Co., Ltd)

1.8 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (D 91107 Schwabach, memmert GmbHt CO.KG)

1.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (EcoTemp TW 20, Julabo)

1.10 ตู้อบอากาศร้อน (hot air oven) (Model 500 D 06061, Memmert GmbHt CO.KG)

1.11 เพอริสทอลติค ปั๊ม (peristaltic pumps) (323S/D, WATSON MAROW BREDEL, U.K.)

1.12 เครื่องบีบแตกเซลล์ (homogeniser / mixer) (X10/25, Ystral GmbH D-7801 Dottingen)

1.13 เครื่องเขย่า (vortex mixture) (MS 1, KIKA Works (Asia) Sdn.Bhd.)

1.14 เครื่องวัดความหนืด (rheometer) (Brookfield DV-III ULTRN)

1.15 เครื่องกรอง (filtration)

1.16 เตาไฟฟ้าปรับอุณหภูมิได้ (hot plate) (HTS-1003, HARMONY)

1.17 ไมโครปิเปตขนาดต่าง ๆ (GILSON)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.18 static element ทำด้วย PVC ความยาว 24 เซนติเมตร (C-04667-02, Cole-Parmer International, U.S.A.)

1.19 ion – exchange chromatography kit (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen)

1.20 สายซิลิโคนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร

1.21 ข้อต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตรรูปตัวที

2. เชื้อที่ใช้ทดลอง

E. coli pTX 0161 (Cobra Therapeutics Co.Ltd., UK) เป็น *E. coli* ที่ดัดแปลงพันธุกรรม (recombinant) โดยมีพลาสมิดที่มีขนาดคู่เบส 7796 คู่เบส (base pairs) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5.06×10^6 ดอลตัน โดยทั่วไปพลามิดมีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยสูงกว่าโปรตีน 100-500 เท่า มีเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 0.93 x 3.25 ไมโครเมตร และมีคุณสมบัติพิเศษในการฆ่าเซลล์มะเร็งภายในร่างกายโดยยีนที่ชื่อว่า CB1954 (Drabek, Guy & Grosveld, 1997)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีสำหรับกระบวนการสลายเซลล์ (ภาคผนวก ก)

3.3.1 0.1 % w/v phenopthaline

3.3.2 สารแขวนลอยเซลล์ (suspension buffer)

3.3.3 สารละลายด่างแก่ (lysis buffer)

3.3.4 สารทำให้เป็นกลาง (neutralisation buffer)

3.3.5 สารช่วยกรอง (diatomeous earth)

3.2 สารเคมีสำหรับการทำอิเลคโตรโฟลิซิส (ภาคผนวก ข)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ค)

- LB broth
- terrific broth
- production medium
- feed medium

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. ขั้นตอนในการทดลอง

5.1 สร้างเครื่องมือ

5.1.1 เตรียมท่อแก้วหรืออะคริลิคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร ความยาว 300 มิลลิเมตร จำนวน 6 ท่อน

5.1.2 เตรียม ไส้ท่อ static mixer ชนิด Kenic 24 elements ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร ความยาว 240 มิลลิเมตร

5.1.3 นำไส้ท่อ static mixer แต่ละอันสอดเข้าไปในท่อแก้วที่เตรียมไว้แต่ละท่อทั้ง 6 ท่อน โดยท่อแก้วแต่ละท่อนเชื่อมต่อกันด้วย ข้อรูปตัวที (T – tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร และท่อแก้วท่อนที่ 3 เชื่อมต่อกับท่อนที่ 4 ด้วยท่อซิลิโคนเพื่อให้ท่อพับลงมาแถวล่าง

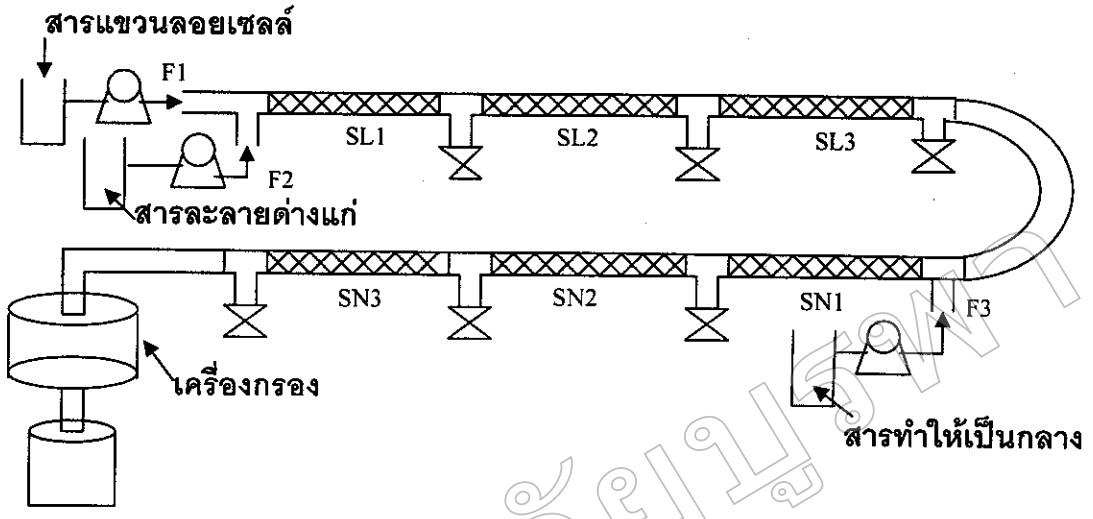
5.1.4 ท่อแก้วด้านที่มีข้อต่อรูปทีตัวแรกช่องหนึ่ง (F1) จะทำหน้าที่เป็นช่องไหลสารแขวนลอยเซลล์เข้าสู่ท่อ และช่องที่สอง (F2) จะเป็นช่องไหลสารละลายด่างเข้าสู่ท่อเพื่อให้สารทั้งสองเจอกันและทำปฏิกิริยากันภายในท่อ

5.1.5 ส่วนช่องเปิดของข้อต่อรูปตัวทีที่ปลายของท่อแก้วที่สาม (F3) จะเป็นช่องสำหรับไหลสารทำให้เป็นกลางเข้าไป

5.1.6 ติดวาล์วที่ช่องเปิดของข้อต่อรูปตัวที วาล์ว SL1, SL2 และ SL3 เป็นวาล์วตัวที่ 1, 2 และ 3 ที่ใช้เก็บตัวอย่าง lysate ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนวาล์ว SN1, SN2 และ SN3 เป็นวาล์วตัวที่ 1, 2 และ 3 สำหรับเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ตามลำดับ

5.1.7 ต่อเครื่องกรองเข้ากับปลายข้อต่อรูปตัวทีของท่อแก้วท่อนสุดท้ายในขั้นตอนการทำให้เป็นกลาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-1 การออกแบบ In-Line Static Mixer สำหรับการสลายเซลล์แบคทีเรียเพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

F1 คือ การไหลสารแขวนลอยเซลล์

F2 คือ การไหลสารละลายด่างแก่

F3 คือ การไหลสารทำให้เป็นกลาง

SL1 คือ ระยะทาง 30 เซนติเมตรขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่าง

SL2 คือ ระยะทาง 60 เซนติเมตรขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่าง

SL3 คือ ระยะทาง 90 เซนติเมตรขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่าง

SN1 คือ ระยะทาง 30 เซนติเมตรขั้นตอนการทำให้เป็นกลาง

SN2 คือ ระยะทาง 60 เซนติเมตรขั้นตอนการทำให้เป็นกลาง

SN3 คือ ระยะทาง 90 เซนติเมตรขั้นตอนการทำให้เป็นกลาง

5.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

5.2.1 การผลิตเซลล์ด้วยวิธีการต่าง ๆ รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ง เนื่องจากไม่ใช่งานทดลองหลักของการวิจัยนี้

5.2.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกะ (batch cultivation)

5.2.1.2 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch cultivation)

5.2.1.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation)

5.2.2 ขั้นตอนการสลายเซลล์โดยวิธีการสลายด้วยด่างแก่ (strong alkaline lysis)

5.2.2.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspension)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผสมเซลล์ *E. coli* pTX0161 ปริมาณ 120 กรัม (น้ำหนักเปียก) กับสารแขวนลอยเซลล์ (ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 1,000 มิลลิลิตร และเติมฟีนอฟทาลีน 0.1 กรัม เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการใช้ homogeniser ที่ความเร็ว 100 – 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 10 นาที

5.2.2.2 การสลายเซลล์ (cell lysis)

ทำการไหลเซลล์แขวนลอยโดยการใช้ peristaltic pump เข้าตรงตำแหน่งเริ่มต้น (F1) (ภาพที่ 3-1) ของชุด static mixer ที่อัตราการไหล 125 หรือ 250 หรือ 500 มิลลิลิตรต่อนาที ขณะเดียวกันการไหลสารละลายด่างโดยการใช้ peristaltic pump ตัวที่ 2 เข้าตรงตำแหน่งเริ่มต้นช่องที่ 2 (F2) ของชุด static mixer ที่อัตราการไหล 250 หรือ 500 หรือ 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที โดยอัตราการไหลสารละลายด่างจะเป็น 2 เท่าของการไหลสารแขวนลอยเซลล์ เมื่อสารแขวนลอยเซลล์เจอกับสารละลายด่างภายในท่อขณะเดียวกันเกิดการกวนผสมซึ่งจะทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกอย่างรวดเร็ว (ภายในระยะเวลาเป็นวินาที) และเมื่อสารทั้งสองชนิดเจอกันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี โดยที่สารแขวนลอยเซลล์ (pH 8.5) มีสีขาวขุ่นผสมกับสารละลายด่าง (pH 12.5) จะได้ lysate ที่เป็นสีแดง ซึ่งเกิดจากฟีนอฟทาลีนทำปฏิกิริยากับด่าง ทำการวัดระยะทางที่สารทั้งสองผสมเข้ากันได้ดีโดยการดูจากการเป็นเนื้อเดียวกันของสีผสม ทำการเก็บตัวอย่าง lysate ที่ตำแหน่งข้อต่อรูปตัวที ที่ปลายท่อแก้วท่อนที่ 1, 2 และ 3 โดยการเก็บ lysate ใส่ ขวด vial ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในแต่ละช่วงทำการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ ทำการ neutralise ตัวอย่างที่ได้ทันทีด้วย N3 buffer จากนั้นเก็บตัวอย่างในน้ำแข็งนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไป

ทำการทดลองที่ 2 โดยเปลี่ยนอัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์เป็น 250 มิลลิลิตรต่อนาทีและอัตราการไหลของสารละลายด่างที่ 500 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการทดลองที่ 3 โดยเปลี่ยนอัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์เป็น 500 มิลลิลิตรต่อนาทีและอัตราการไหลของสารละลายด่างที่ 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการวิเคราะห์ระยะทาง เวลาผสม และสกัดพลาสมิดทำเหมือนกับวิธีการข้างต้น

5.2.2.3 การทำให้เป็นกลาง (neutralisation)

ทำการไหลสารละลายเป็นกลางโดยการใช้ peristaltic pump ตัวที่ 3 ที่อัตราการไหลเดียวกับการไหลเซลล์แขวนลอยของการทดลองนั้น ๆ คือ 125 หรือ 250 หรือ 500 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเมื่อ lysate ไหลผ่านท่อมาถึงจุดเริ่มที่ทำการไหลสารทำให้ lysate เป็นกลาง (F3) จึงเริ่มทำการไหลสารละลายเป็นกลางเข้าไปให้เจอกับ lysate ทำการวัดระยะทางที่ lysate ผสมกันกับสารทำให้เป็นกลางจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของสี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ที่เกิดขึ้นโดย lysate ที่ไหลผ่านท่อมาจะมีสีแดง เมื่อมาเจอกับสารทำให้เป็นกลางที่ไหลเข้าไปจะเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น เนื่องจาก pH ของ lysate ลดลง จาก 12.5 เป็น 5.5 ซึ่งสีขาวที่เกิดขึ้นนี้เป็นตัวบอกให้รู้ว่าการผสมของสารเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณข้อต่อรูปตัวที ที่ปลายท่อแก้วท่อนที่ SN1, SN2 และ SN3 (ซึ่งคิดเป็นระยะทางของการทำให้เป็นกลางเท่ากับ 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ตามลำดับ) นับจากปลายท่อแก้วท่อนที่เริ่มทำการไหลสารทำให้เป็นกลาง (F3) เข้าไป โดยการเก็บ lysate ใส่ขวด vial ซึ่งในแต่ละช่วงทำการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ นำตัวอย่างที่ได้มาปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับส่วนของ N3 0.5 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในหลอดแอบเพนดอร์ฟ (eppendoft tube) นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปทำบริสุทธิ์และวิเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

5.2.3 การออกแบบและสร้างเครื่องกรอง

เครื่องกรองที่ใช้ศึกษาการสลายเซลล์สร้างเองด้วยสแตนเลสและมีตะแกรงที่เป็นสแตนเลสเป็นตัวรองรับตัวช่วยการกรอง คือ diatomaceous earth ระบบจะมีตัววัดความดันและระบบท่อข้อต่อและวาล์วต่าง ๆ ที่ทำด้วยสแตนเลส ระบบการกรองนี้จะเป็นแบบใช้ความดันโดยมี peristaltic pumps เป็นตัวปั๊มของเหลวผ่านระบบการกรอง

ตารางที่ 3-1 อัตราการไหลสารต่าง ๆ เข้าระบบ In-Line Static Mixers

	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)		
	สารแขวนลอยเซลล์	สารละลายด่าง	สารละลายเป็นกลาง
การทดลองที่ 1	125	250	125
การทดลองที่ 2	250	500	250
การทดลองที่ 3	500	1,000	500

การทดลองทั้ง 3 การทดลองที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง 125: 250: 125, 250: 500: 250 และ 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที แต่ละการทดลองทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

5.2.4 การวัดค่าความหนืด

วัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดรุ่น Brookfield DV-III ULTRN ด้วย spindle ชนิด SC 18 และกระบอกชนิด 13 RP ขนาดความจุ 8 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2.4.1 นำสารผสมในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ได้จากอัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง 125: 250: 125, 250: 500: 250 และ 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ในขวด vial ใสลงในกระบอกรีโอมิเตอร์เป็นการวัดตัวอย่าง ณ เวลาจริง (real time)

5.2.4.2 ทำการให้อัตราแรงเฉือนในกระบอกรีโอมิเตอร์ โดยเพิ่มอัตราเฉือนครั้งละ 15 ต่อวินาที จากอัตราเฉือนเริ่มต้นที่ 0 ต่อวินาที จนถึงอัตราเฉือนสุดท้ายที่ 330 ต่อวินาที เป็นเวลา 25 นาที

5.2.4.3 บันทึกค่าโดยการพล็อตกราฟระหว่างอัตราแรงเฉือนกับความเค้นเฉือนและอัตราแรงเฉือนกับความหนืด

5.3 ทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธี ion – exchange chromatography miniprep (Qiagen, 1997)

5.3.1 ดูดตัวอย่างหลังจากขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแอบเพนดอร์พนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

5.3.2 ดูด clear supernatant จากข้อ 5.3.1 จำนวน 600 ไมโครลิตร ใส่ใน ion – exchange column ชนิด QIAprep Spin Miniprep Kit นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นเทของเหลวส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (column) ทิ้ง

5.3.3 ล้างคอลัมน์ ด้วย PB buffer 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง

5.3.4 ล้างคอลัมน์ ด้วย PE buffer 0.75 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที จากนั้น เทส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง

5.3.5 นำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1 ครั้งเป็นเวลา 1 นาที

5.3.6 นำคอลัมน์ ใส่ในหลอดแอบเพนดอร์พเปล่า จากนั้นชะ (elute) ดีเอ็นเอ ด้วย EB buffer 150 ไมโครลิตร โดยทำการปั่นเหวี่ยง 1 นาที นำสารละลายที่ได้ในหลอดแอบเพนดอร์พไปทำการตรวจสอบหาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

5.4 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์

5.4.1 นำสารละลายพลาสมิดที่ได้จากวิธีการในข้อ 5.3.6 125 ไมโครลิตร เจือจางด้วย EB buffer 900 ไมโครลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.4.2 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวี (absorbance; A) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Beckman DU- 600

5.4.3 คำนวณค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากค่า A_{260} โดย

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ [DNA] (μg/ml) = A_{260} x 50 x dilution facter

5.4.4 คำนวณค่า A_{260}/ A_{280} เพื่อบอกความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้

5.5 อิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นวิธีการวิเคราะห์เพื่อดูพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการรันบนอะกาโรสเจล

5.5.1 เตรียมอุปกรณ์ชุดสำหรับการรันเจล ประกอบด้วย gel running chamber ถาดรองเจล เป็นต้น

5.5.2 เตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1 % ใน TBE buffer เป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเอทธีเดียมโบรไมด์ (ethidiumbromide) 5 มิลลิลิตร โดยที่ต้องนำอะกาโรสเจล 1 % และ TBE buffer 100 มิลลิลิตร ไปทำละลายทิ้งให้เย็นแล้วค่อยเติมเอทธีเดียมโบรไมด์ 5 มิลลิลิตรลงไป

5.5.3 เทส่วนผสมดังกล่าวลงบนถาดรองเจลทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็งตัว

5.5.4 ขั้นต่อไปนำตัวอย่างจากข้อ 5.3.6 (ที่เหลือหลังจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer (6X) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ให้เข้ากันทำการหยอดส่วนของตัวอย่างลงในช่องของอากาโรสเจลปริมาณ 6 ไมโครลิตร โดยช่องแรกนั้นโหลดด้วย marker Hyper Ladder I และ λ DNA/*Eco*RI + HindIII

5.5.5 เปิดกระแสไฟฟ้ามีค่าความต่างศักย์เป็น 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

5.5.6 จากการรันเจลเสร็จแล้วนำไปส่องดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator

5.5.7 ถ่ายภาพเพื่อบันทึกผลต่อไป

5.6 วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่องของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายต่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง ที่อัตราการไหล 125: 250:125, 250: 500: 250 และ 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตรตามลำดับ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 วิเคราะห์ด้วยวิธี duncan

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการวิเคราะห์อัตราการไหลที่ต่างกัน และระยะทางที่ต่างกันว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University