บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ

1) Modified Tyrode-HEPES-BSA buffer (MT-HEPES-BSA buffer, pH 7.4) *ตารางที่ 1* (ภาคผนวก)
2) Modified Tyrode-HEPES-BSA buffer pH 7.4 ที่มี heparin 5 units/ml ละลายอยู่ (freshly prepare)
3) 10 x Krebs Ringer Phosphate buffer pH 7.4 (10xKRP) *ตารางที่ 2* (ภาคผนวก)
4) 1 x Krebs Ringer Phosphate buffer pH 7.4 (1xKRP) *ตารางที่ 3* (ภาคผนวก)

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง และเก็บเซลล์จากช่องท้องหนู

1) หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ จะถูกทำให้ตายโดยการดึงคอ
2) เช็ดผิวหนังบริเวณช่องท้องของหนูด้วย 70% ethanol
3) ฉีดสารละลาย MT-HEPES-BSA Buffer containing 5 units/ml of heparin (freshly prepare) ปริมาตร 20 mL เข้าช่องท้องหนู (peritoneal cavity) แล้วนวดคลึงเบาๆ รอบๆ ช่องท้องประมาณ 90 วินาที
4) ผ่าตัดเปิดผนังช่องท้องหนู แล้วใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลาย buffer ในช่องท้องหนูกลับคืนมาใส่ใน polypropylene tube ขนาด 15 mL
5) นำ polypropylene tube ที่มี buffer จากช่องท้องหนูไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm, 5°C เป็นเวลา 7 นาที แล้วทิ้งชั้นสารละลายไป
6) Reconstituted cell pellets ด้วยสารละลาย MT-HEPES-BSA buffer, pH 7.4 ปริมาตร 10 mL นำไป centrifuge เพื่อล้างอีกครั้ง แล้วทิ้งชั้นสารละลาย buffer ที่ใช้ล้างไป (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
7) เติมสารละลาย MT-HEPES-BSA buffer, pH 7.4 ปริมาตร 2 mL ลงใน cell pellets ที่ได้ เพื่อ reconstituted (ได้เป็น cells suspension)
8) ศึกษาเปรียบเทียบผลของการสกัดแยกด้วยสารละลาย 2 ชนิด โดยการนำ cells suspension ที่ได้มา pool รวมกัน และแบ่งไปวางบนสารละลาย 38%w/v BSA หรือ 60%v/v Percoll®

3. การสกัดแยกด้วยวิธี density gradient centrifugation

A. <u>การใช้ 38% Bovine Serum Albumin (38% BSA) เป็นสารละลายสกัด</u>

1) ละลาย Bovine Serum Albumin ในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 38% w/v
2) นำ cells suspension ที่เตรียมได้จากข้อ 2.8 ปริมาตร 2 mL วางบนสารละลาย 38%w/v BSA ปริมาตร 4 mL ซึ่งเตรียมพร้อมอยู่ใน polypropylene tube ขนาด 50 mL วางทิ้งไว้ประมาณ 25 นาที
3) นำ polypropylene tube ที่มี buffer จากช่องท้องหนูไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm, ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งชั้นสารละลายชั้นบนที่เป็น buffer และ ชั้นผิวบริเวณ buffer-BSA interface ทิ้งไป
4) Mast cells ในชั้นของสารละลาย 38%w/v BSA จะถูกเจือจางประมาณ 12 เท่าด้วยสารละลาย buffer แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm, ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งชั้นสารละลายไป

5) Reconstituted cell pellets ด้วยสารละลาย buffer ปริมาตร 10 mL นำไป centrifuge เพื่อล้างอีกครั้ง แล้วทิ้งชั้นสารละลาย buffer ที่ใช้ล้างไป (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
6) เติมสารละลาย buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใน cell pellets เพื่อ reconstituted และเก็บใน eppendorf

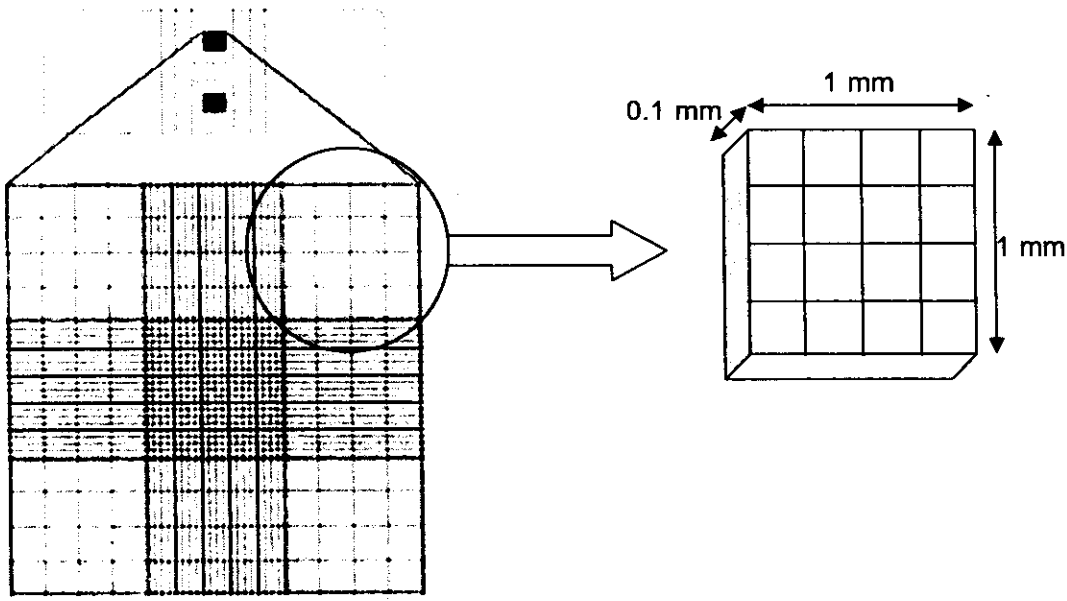
B. การใช้ 60% Percoll® เป็นสารละลายสกัด

1) ให้เตรียม 90%v/v iso-osmotic Percoll® โดยนำ 100%v/v Percoll® ปริมาตร 9 ส่วน ผสมกับ 10xKRP ปริมาตร 1 ส่วน
2) ให้เจือจางต่อด้วย 1xKRP จนได้ 60%v/v Percoll®
3) นำ cells suspension ที่เตรียมได้จากข้อ 2.8 ปริมาตร 2 mL วางบนสารละลาย 60%v/v Percoll® ปริมาตร 12 mL ซึ่งเตรียมพร้อมอยู่ใน polypropylene tube ขนาด 50 mL
4) นำ tube ไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm, ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งชั้นสารละลายชั้นบนที่เป็น 60%v/v Percoll® ทิ้งไป
5) reconstituted cell pellets ด้วยสารละลาย buffer (MT-HEPES-BSA) ปริมาตร 10 mL นำไป centrifuge เพื่อล้างอีกครั้ง แล้วทิ้งชั้นสารละลาย buffer ที่ใช้ล้างไป (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
6) เติมสารละลาย buffer (MT-HEPES-BSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใน cell pellets เพื่อ reconstituted และเก็บใน eppendorf

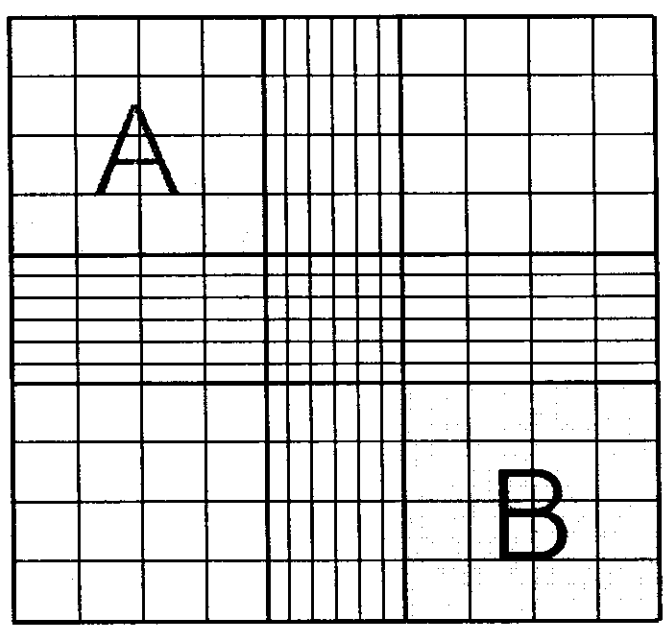
4. การนับจำนวนเซลล์รอดชีวิต

1) นำ cell pellets ที่เตรียมได้จากวิธีการสกัดแยกทั้ง 2 วิธี ไปหาปริมาณ mast cells ที่มีชีวิต โดยการย้อมด้วยสี tryptan blue ในอัตราส่วน 1:1 (เซลล์ที่ยังมีชีวิต จะไม่ดูดซับสีเข้าไป)
2) นับจำนวน mast cells ที่ปรากฏอยู่ในช่องตารางที่กำหนดของแผ่นสไลด์สำหรับนับเซลล์ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ (Hemocytometer) โดยใช้กำลังขยาย 10X ดังนี้
    2.1 นับจำนวน mast cell ที่ตกอยู่ในตารางบนพื้นที่ A *(รูปที่ 2)*
    2.2 นับจำนวน mast cell ซ้ำอีกครั้ง โดยนับจำนวนที่ตกอยู่บนพื้นที่ B *(รูปที่ 2)*
    2.3 ค่าที่นับได้จะถูกคูณด้วย 2 เนื่องจากความเข้มข้นถูกเจือจางโดยสีย้อมในอัตราส่วน 1:1 บันทึกจำนวนเซลล์ที่ได้ ($\times 10^4$ cells/mL)

1 ช่องที่ทำการนับจำนวนเซลล์มีปริมาตรเท่ากับ 0.1 mm × 1.0 mm × 1.0 mm = 10^{-4} cm^3 *(รูปที่ 1)* ดังนั้น ปริมาตร 1 mL จะมีจำนวนเซลล์ เท่ากับ จำนวนที่นับได้ใน 1 ช่อง × 10^4 cells



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของ Hemocytometer และขนาดของช่องตารางสำหรับคำนวนปริมาณเซลล์



รูปที่ 2 ตำแหน่งพื้นที่ของ Hemocytometer ที่ใช้นับจำนวนเซลล์