การเพาะเลี้ยงเซลล์และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

(Cell Culture and MTT cell cytotoxicity method)

ขั้นตอนวิธีการทดสอบ

เครื่องมือ-วัสดุอุปรณ์ที่ใช้

1. Biosafety cabinet class II
2. Incubator CO_2 37 C^o
3. Pipette
4. ลูกยาง
5. Auto pipette (P10, P100, P1000, P5ml, P10 ml)
6. Tip (P10, P100, P1000, P5ml, P10 ml)
7. Cell tissue culture dish เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 35 mm
8. Cell tissue culture dish เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 60 mm
9. Tissue culture flask 25 cm^2
10. 96-well plates
11. 24-well plates
12. 48-well plates
13. ขวดแก้ว (ขวด duran) ขนาด 100 ml
14. ถุงร้อน
15. หนังยางรัดของ
16. ฟลอยด์
17. ถาด

วิธีการทดลอง

1.การเลี้ยงเซลล์ Primary Gingival Fibroblast; Normal, Human, Adult (HGF) (ATCC® PCS-201-018™)

1) นำเซลล์ **Primary Gingival Fibroblast; Normal, Human, Adult (HGF) (ATCC® PCS-201-018™)** ลงในจานเพาะเลี้ยง Cell tissue culture dish เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 60 mm เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete Medium: CM) ที่ประกอบไปด้วย

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (%)	ปริมาตร (mL)	บริษัทที่ขาย/จำหน่วย
DMEM	88	88	Gibgo/Gibthai
Antibiotic/Antimicrobial	1	1	Gibgo/Gibthai
L-glutamine	1	1	Gibgo/Gibthai
Fetal Bovine Serum (FBS)	10	10	Gibgo/Gibthai
ปริมาตรรวม	100	100	-

2) ใส่ปริมาตรของ Complete Medium จานเพาะเลี้ยงขนาด 60 mm ละ 3 ml

3) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน

4) เลี้ยงจนชิ้นเนื้อเติบโต เรียงตัวเป็นชั้นเดียว หนาแน่นประมาณ 70-80% บน plate จึงเข้าสู่การ subculture หรือ pass cell/tissue (2-3 วัน) เป็นลำดับต่อไป

2.Subculture หรือ pass cell ด้วย Trypsinization

1) ดูดอาหารเก่าทิ้ง เติม DMEM ลงไป เพื่อล้าง FBS ที่มีในอาหาร เพื่อให้เอนไซม์ Trypsin ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) ดูด DMEM ทิ้ง เติม 0.25%Trypsin-EDTA ลงไป โดยปริมาตรที่ใส่ คือ 3 ml ต่อ 1 plate ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 mm ตามลำดับ)

3) จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่ม 5% CO_2 อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หด พร้อมหลุดออกจาก plate

4) เติม FBS ลงไป 3 หยด ต่อ ปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ Trypsin

5) จากนั้น ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้น-ลง เพื่อชะเซลล์ให้หลุดจาก plate

6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง

7) ใส่อาหาร Complete culture media ใหม่ลงไปตามปริมาตรที่เหมาะสม ปิเปตต์ขึ้น-ลง ให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ อาหาร จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่ plate ให้เหมาะสม

8) นำไปเลี้ยงในตู้บ่ม 5%CO_2 อุณหภูมิ 37ºC

9) ทำเช่นนี้ไปเรื่อย จนกว่าจะได้ Passage ที่ 5

3.การทำ Cytotoxicity ดูความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay

เมื่อได้ Passage ที่ 5 แล้ว

1) ดูดอาหารเก่าทิ้ง เติม DMEM ลงไป เพื่อล้าง FBS ที่มีในอาหาร เพื่อให้เอนไซม์ Trypsin ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) ดูด DMEM ทิ้ง เติม 0.25%Trypsin-EDTA ลงไป โดยปริมาตรที่ใส่ คือ 3 ml ต่อ 1 plate ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 mm ตามลำดับ)

3) จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่ม 5% CO_2 อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หด พร้อมหลุดออกจาก plate

4) เติม FBS ลงไป 3 หยด ต่อ ปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ Trypsin

5) จากนั้น ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้น-ลง เพื่อชะเซลล์ให้หลุดจาก plate

6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง

7) ใส่อาหาร Complete culture media ใหม่ลงไป 1 ml ดูดขึ้นลงขึ้น-ลง ให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ อาหารและนำไป Vortex เพื่อให้เซลล์กระจายแตกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

8) การนับเซลล์และนับจำนวนเซลล์ให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทดลองโดยการทดลองนี้จะใช้เซลล์ 20,000 (cells/ml)

9) ดูดเซลล์มา 10 µl ผสมกับสีย้อม trypan blue 10 µl ให้เข้ากันใน Microcentrifuge tube

10) นับเซลล์ใช้เครื่อง Cell Counter (Countess) โดยเครื่องจะแสดงค่าจำนวนเซลล์

*หน่วยคือ cell/ml

จากนั้นนำมาคำนวณ จากสูตร

C1V1=C2V2

C1= จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้จากเครื่อง หน่วย cell/ml หรือ cell/µl

C2=จำนวนเซลล์ที่เราต้องการที่การ คือ 20,000 cell/ml

V1=ปริมาตรที่จะต้องดูดออกมาจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น หน่วย ml หรือ µl

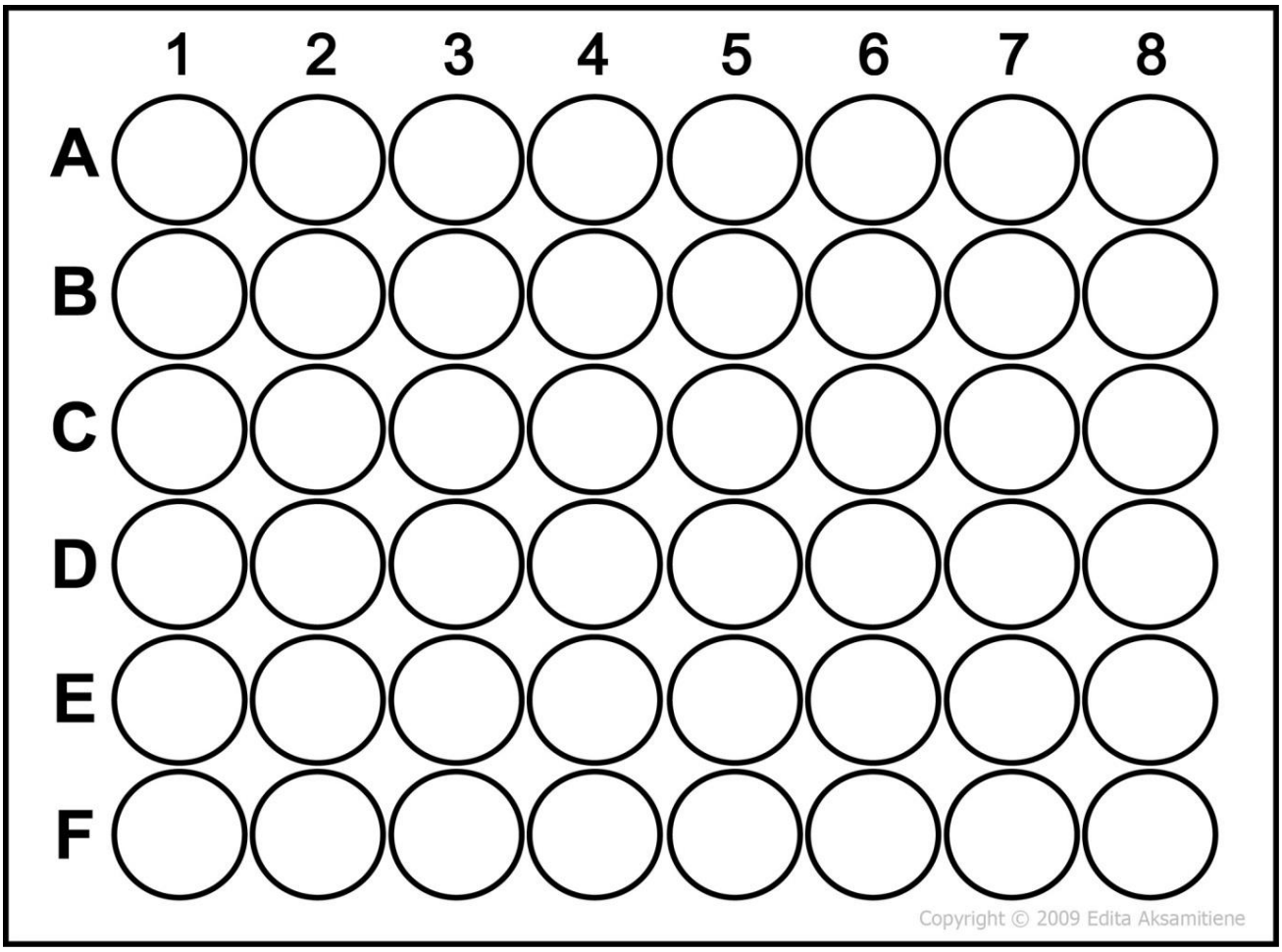
V2= ปริมาตรสุดท้ายที่เราจะต้องการทั้งหมด หน่วย ml หรือ µl

11) เมื่อเตรียมเซลล์เรียบร้อยแล้ว เราจะทำการ plate cell หรือ seed cell ลงใน 48-well plate จำนวนเซลล์ คือ 20,000 cell/ml ในปริมาตร 100 µl plate ละ 42 หลุม จำนวน 3 plate เพื่อทดสอบ เป็นช่วงเวลาจำนวนตั้ง 1 ถึง 3 วัน

12) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะที่ก้นหลุมของ plate

13) เติมสารตัวอย่างที่ต้องการนำมาทดสอบลงไป หลุมละ 200 ul โดยใส่จากความเข้มข้นน้อยไปความเข้มข้นมาก และต้องมี Control ด้วย ใช้ CM และ Triton-X

14) จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่ม 5%CO_2 อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 3 วัน (72 ชั่วโมง), 2 วัน (48 ชั่วโมง)



15) เมื่อครบกำหนดเวลาที่ต้องการเอา 48-well plate ออกจากตู้ 5%CO_2 อุณหภูมิ 37ºC ดูด media เก่าทิ้งจากนั้น ปิเปตต์สารละลาย 5 mg/ml MTT (คือ MTT 5 mg ละลายใน PBS 1 ml) ปริมาตร 60 µl/well ลงไปแล้วใส่ DMEM without phenol red 240 µl/well (Final Concentration MTT : 1 mg/ml MTT) นำไปบ่มในตู้บ่ม 5% CO_2 อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

หมายเหตุ; ต้องกรองสารละลาย MTT และห่อฟลอยด์ก่อนใช้ด้วย (กรองผ่าน 0.22 µm)!!

16) จากนั้นปิเปตต์เอา media ที่มีสารละลาย MTT ทิ้งไป

17) เติมสารละลาย DMSO ลงไป 300 µl/well ผสมให้เข้ากัน อย่าให้มีผลึกของ formazan หลงเหลืออยู่ (เคาะเบา ๆ ที่ด้านข้างของ plate)

****หากเซลล์เป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิต enzyme mitochondrial reductase บน mitochondria จะจับกับ MTT (ที่มีสีเหลือง) กลายเป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วง**

18) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm

19) หา **%Viability** จากสูตร

$$\text{Viability (\%)} = 100 \times OD_{570\ \text{Sample}} / OD_{570\ \text{Blank (Control)}}$$