

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

คู่มือวิธีพื้นฐานการเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง
และการทดสอบฤทธิ์สารสกัดต่อการเจริญของเซลล์

ขั้นตอนการศึกษาการเจริญของเซลล์ (Growth Curve)

การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีการเติม Fetal Bovine Serum (FBS) 10% เมื่อเซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นจะทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเป็นกรด สังกะตจากสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนไป จึงต้องทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน

เนื่องจากเซลล์เมลาโนมาที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการเกาะพื้นผิว (adherent cells) ในขั้นตอนการ subculture จึงต้องทำการย่อยเซลล์เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinization)

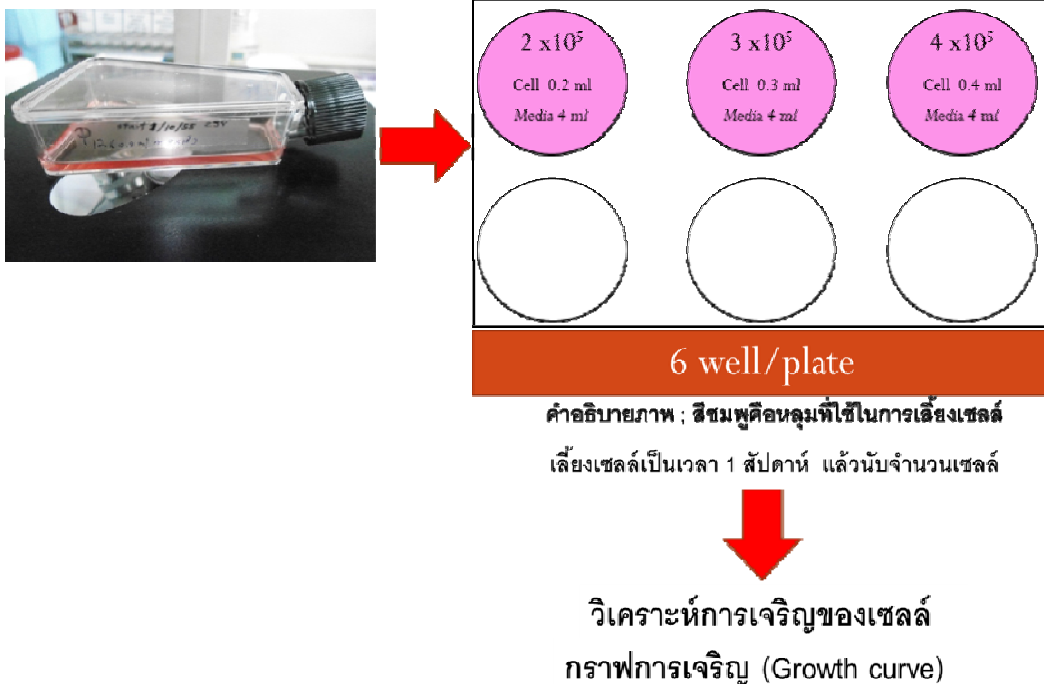
จากนั้นจึงทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด จึงนำเซลล์ดังกล่าวในจำนวนที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงต่อไป โดยขั้นตอนในการย่อยเซลล์มีดังนี้

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ flask ให้หมด
2. ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 5 มิลลิลิตรเพื่อไม่ให้มีอาหารเลี้ยงเซลล์เคลือบอยู่
3. จากนั้นให้ดูดสารละลาย PBS จากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ (Flask) ทิ้ง
4. เติมสารละลาย Trypsin/EDTA ปริมาตร 1 ml ลงในภาชนะเพื่อทำการย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะ
5. เมื่อเซลล์หลุดหมดเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 4 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์แล้วใช้ Pipette ดูดฟ่นเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดและกระจายออกจากกัน
6. จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ใน Centrifuge Tube ขนาด 15 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง G8-15R centrifuge ที่ความเร็ว 1,600 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
7. หลังจากนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง G8-15R centrifuge แล้วจากนั้นจึงดูดน้ำส่วนบนทิ้งไป จะได้กลุ่มเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้น Centrifuge Tube
8. จากนั้นนำกลุ่มเซลล์ที่เหลืออยู่ไปย้อมด้วยสี trypan blue ในอัตราส่วน 1:10 cell 10 μ l : trypan blue 90 μ l โดยใช้ Haemocytometer ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x
9. เมื่อได้จำนวนเซลล์แล้ว นำมาคำนวณปริมาณเซลล์ที่ได้ก่อนนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในภาชนะใหม่ต่อไป

การศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมา (Growth Curve)

1. เลี้ยงเซลล์เมลาโนมาที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2×10^5 , 3×10^5 และ 4×10^5 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีการเติม FBS 10% ใน 6 well/plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 7 วัน

2. ทำการย่อยเซลล์และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตทุกวันโดยดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ 6 well/plate ให้หมด
3. จากนั้นใส่ PBS จำนวน 2 ml. ลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ 6 well/plate
4. ดูดสารละลาย PBS จากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ 6 well/plate ที่ตั้ง
5. เติมสารละลาย Trypsin/EDTA ปริมาตร 0.5 ml ลงในภาชนะเพื่อทำการย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะ
6. เมื่อเซลล์หลุดหมดเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 0.5 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์แล้วใช้ Pipette ดูดพ่นเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดและกระจายออกจากกัน
7. จากนั้นนำเซลล์ไปย้อมด้วยสี trypan blue ในอัตราส่วน 1:5 cell 10 μ l : trypan blue 40 μ l โดยใช้ Haemocytometer ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x
8. เมื่อได้จำนวนเซลล์แล้ว นำมาคำนวณปริมาณเซลล์จากสูตรการคำนวณจำนวนเซลล์



ภาพที่ 1 แสดงการศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมา (Growth Curve)

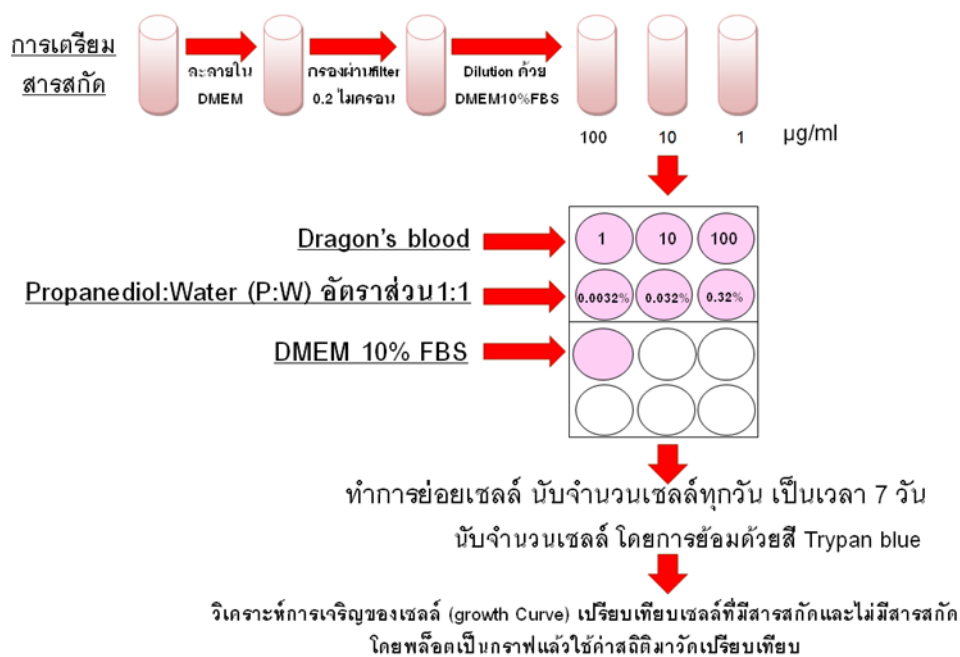
การทดสอบฤทธิ์สารสกัดต่อการเจริญของเซลล์

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา โดยจำนวนเซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ 2×10^5 เซลล์ต่อหลอดโดยเซลล์ถูกเลี้ยงใน Media 2 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด Media ออกแล้วเติม Media ที่มีสารสกัด และตัวทำละลายในความเข้มข้นของสาร

สกัด 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ และเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนับจำนวนเซลล์ในแต่ละวัน และนำจำนวนเซลล์มาวิเคราะห์โดยวาดกราฟการเจริญของเซลล์ (Growth Curve)

ทำการทดสอบเซลล์เมลาโนมา กับสารสกัด และตัวทำละลายสารสกัดดังกล่าวที่มีการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นค่าต่างๆ ดังแสดงตัวอย่างไว้ในภาพการศึกษาการทดสอบฤทธิ์สารสกัดต่อการเจริญของเซลล์

1. DMEM 10% PBS (Control)
2. DMEM 10% PBS Extract 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$
3. DMEM 10% PBS Extract 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$
4. DMEM 10% PBS Extract 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$
5. DMEM 10% PBS เปรอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย
6. DMEM 10% PBS เปรอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย
7. DMEM 10% PBS เปรอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย



ภาพที่ 2 แสดงการศึกษาการทดสอบฤทธิ์สารสกัดต่อการเจริญของเซลล์

ขั้นตอนการ subculture cell ใน 6 well/plate ที่มีสารสกัด

1. ทำความสะอาดอุปกรณ์ด้วยวิธี Aseptic Technique

2. ทำการย่อยเซลล์และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตทุกวันโดยดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ 6 well/plate ให้หมด
3. จากนั้นใส่ PBS จำนวน 2 ml. ลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ 6 well/plate
4. ดูดสารละลาย PBS จากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ 6 well/plate ที่ทิ้ง
5. เติมสารละลาย Trypsin/EDTA ปริมาตร 0.5 ml ลงในภาชนะเพื่อทำการย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะ
6. เมื่อเซลล์หลุดหมดเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 0.5 ml. เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ แล้วใช้ Pipette ดูดพ่นเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดและกระจายออกจากกัน
7. จากนั้นนำเซลล์ไปย้อมด้วยสี trypan blue ในอัตราส่วน 1:5 cell 10 μ l : trypan blue 40 μ l โดยใช้ Haemocytometer ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x
8. เมื่อได้จำนวนเซลล์แล้ว นำมาคำนวณปริมาณเซลล์จากสูตรการคำนวณจำนวนเซลล์

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผศ. ดร. ทศนีย์ พาณิชย์กุล

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Asst.Prof. Tasanee Panichakul, Ph.D.

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

ถ. สิรินคร เขตบางพลัด กทม. 10700 โทร 02-4239423, 085-1994988,

email tasanee_p@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2528

ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2532

ปริญญาเอก ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาอายุรศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2550

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Cell biology, Hematopoietic stem cells, Immunology, Cell culture, Cholangiocarcinoma, Malaria culture

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง การควบคุมและป้องกันโรคติดต่อมือเท้าปากในเด็กปฐมวัยและตรวจหาเชื้อไวรัส (Control and prevention of Hand-foot-mouth disease in children and viruses detection) ทุนสนับสนุนโดยมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปี 2552 (ดำเนินการลุล่วง 100 %)

หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง ผลกระทบต่อการพัฒนาของเม็ดเลือดแดงที่เกิดจากการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ *Plasmodium vivax* (Effect of *Plasmodium vivax* infection on erythropoietic development) ทุนสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปี 2553-2555 (ดำเนินการลุล่วง 100 %)

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้วในปี 2009-2012

1. **Panichakul T.**, Thophon S. Hand, foot and mouth disease in children. J Public Health. 2009, 39: 214-223. (supported by University Suan Dusit Rajabhat University)
2. **Panichakul T.**, Thophon S., Kakhai C., Patumasut P., Somboon S., Sukasem C., Srichanrusami C. Surveillance and prevention of enterovirus spreading and hand-foot-mouth disease occurrence in young children. J Public Health & Develop. 2010, 8: 173-185. (supported by University Suan Dusit Rajabhat University)
3. Ponnikorn S., **Panichakul T.**, Sresanga K., Wongboriuth C., Roytrakul S., Hongeng S., Tungpradabkul S. Phosphoproteomic analysis of apoptotic hematopoietic stem cells from hemoglobin E/ α -thalassemia. J. Translational Medicine. 2011, 9: 96. (supported by Mahidol University)
4. Chootong P., **Panichakul T.**, Permmongkol C., Barnes S.J., Udomsangpetch R., Adams J.H. Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: Approach to Plasmodium vivax vaccine development in Thailand. Plos One, 2012, 4: e35769.
5. **Panichakul T.**, Payuhakrit W., Panburana P., Wongborisuth C., Hongeng S., Udomsangpetch R. Suppression of erythroid development in vitro by Plasmodium vivax. Malaria J, 2012. (supported by Thailand research fund, Commission on Higher Education, Ministry of Education and Suan Dusit Rajabhat University, Bangkok, Thailand, MRG5380092)

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ณัฐพร บุษิวาด

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Nattaporn Boohuad

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อ หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต โทรศัพท์ 02 4239420-1 โทรศัพท์มือถือ 089 1416790 E-mail NATTAPORN2608@GMAIL.COM

ประวัติการศึกษา

1998-2001 B. Sc. (Environmental science) Silpakorn University,
2005-2007 M. Sc. (Cosmetic science) MaeFahLaung University

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

ชื่อภาษาไทย นางประดับฟ้า นาคนก

ชื่อภาษาอังกฤษ Mrs Pradupfah Narknok

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ทำงาน หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต e-mail pradupfah_n@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

| ปีที่จบการศึกษา | ระดับปริญญา | ปริญญา | สาขาวิชา | ชื่อสถาบันฯ | ประเทศ |
|-----------------|-------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|--------|
| 2545 | ตรี | วิทยาศาสตร์บัณฑิต | เคมี | มหาวิทยาลัยมหาสารคาม | ไทย |
| 2550 | โท | วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต | วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง | มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง | ไทย |

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

การตั้งตำรับเครื่องสำอางจากธรรมชาติ

ประสบการณ์ด้านงานวิจัย

2550 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ขี้ผึ้งจากลูกเดือย.