บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อ *Malassezia*

เชื้อ *Malassezia* ที่ใช้ในการทดลองคือ *M. furfur* CBS 1878^{T} (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Susumu Kajiwara แห่งมหาวิทยาลัย Tokyo Institute of Technology ประเทศญี่ปุ่น

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

(1) YPD broth (1% yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glucose, 2% agar, 0.5% Tween 60, 2% agar)

(2) YPD agar (1% yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glucose, 2% agar, 0.5% Tween 60, 2% agar)

2. สารเคมี

(1) Yeast extract

(2) Bacto peptone

(3) D-glucose

(4) Tween 60

(5) Tween 80

(6) Ethanol

(7) Agar

(8) Isolation buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% Triton X-100, 1 mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS)

(9) Protein extraction buffer (PEB) (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl2, 50 mM NaCl, 2% Triton X-100, 5 % glycerol, pH 7.5)

(10) Glass beads (450-600 µm, Sigma)

(11) Tris-HCl

(12) Ethylenediaminetetraacetic acid

(13) Phenol

(14) Chloroform

(15) Triton X-100

(16) NaCl

(17) Agarose

(18) 2X Taq Master Mix (Vivantis)

(19) 10X TAE buffer (Vivantis)

(20) UltraPower™ DNA stain (Syngene)

(21) 6X Loading dye (Vivantis)

(22) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

(23) GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)

(24) TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., USA)

(25) ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, Japan)

(26) Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs)

(27) Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit 30 kDa cut off (Merck Millipore, USA)

(28) Bradford reagent (Bio-Rad, USA)

(29) 4-nitrophenyl palmitate (4-NPP) (Sigma, USA)

(30) 4-nitrophenol (4-NP) (Sigma, USA)

(31) microplate

3. อุปกรณ์เครื่องมือ

(1) Incubator

(2) Shaking incubator

(3) Autoclave

(4) Digital balance

(5) Laminar air flow hood

(6) Vortex

(7) Spatula

(8) Flask

(9) Beaker

(10) Cylinder

(11) Alcohol burner
(12) Vial tubes
(13) Micropipettes and tips
(14) Eppendorf tube
(15) Electrophoresis chamber (Biometra)
(16) Gel documentation (Biorad
(17) Microwave machine
(18) Refrigerator
(19) Deep freezer (-80°C)
(20) Spectrophotometer (Biorad)
(21) Microplate Reader (BioTek)
(22) PCR Thermal Cycler (Biometra)

4. ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ RT-PCR และ qPCR แสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์สำหรับ RT-PCR

Genes	Primers	Sequences (5’ to 3’)	Annealing temperature (°C)
beta-tubulin	βtub-F2	AGGGCTTCCAGATCACTCACT	55
(βtub)	βtub-R2	CTCCACAAAGTAGGACGAGTTCTT	
Lipase 1 (LIP1)	Lip1-F2	AACTCGGAGAGCAATTTTGTATTC	55
	Lip1-R2	GAATACGTTGTGAATTTGACCTGA	
Lipase 2 (LIP2)	Lip2-F2	TCATTATCCCTGAAAACTACGACA	55
	Lip2-R2	GTGAGCTTGTTGAGGATGTTGAG	
Lipase 3 (LIP3)	Lip3-F2	CTGACCAGGACCCCTTCTACTAC	52
	Lip3-R1	GTCCAGATCTGGTTGTTGAA	
Lipase 4 (LIP4)	Lip4-F2	AACTTGGTTGTTGATGAAAGTTTG	55
	Lip4-R2	GTTCAACTTGTCATCCGTGTATGT	
Lipase 5 (LIP5)	Lip5F	CCAGTGTGCTCCTTCCTATTCTAT	52
	Lip5R	CTAAACGGAACAATCTCATCATGT	
Lipase 6 (LIP6)	Lip6F	CCGACTACGAAGGCAAGAAC	55
	Lip6R	GTCCTGGATAAAGAAGAGCACATT	

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์สำหรับ qPCR

Genes	Primers	Sequences (5’ to 3’)

beta-tubulin (*βtub*)	TUB1-RTf	GGAGAACAGTGACGAGACGTTCTGTA
	TUB1-RTr	CACAAGCTGGTTCAGGTCGTCGTA
Lipase 1 (*LIP1*)	LIP1-RTf	TCTTTTCTGGTCTCATCCTTGCAGGT
	LIP1-RTr	CCTTCCCTCTGGTCTGGAACTCATAC
Lipase 2 (*LIP2*)	LIP2-RTf	CCCTGAAAACTACGACAAGGACAAGC
	LIP2-RTr	CCTCGTGCAGCAGTGTCGTAATAAAG
Lipase 3 (*LIP3*)	LIP3-RTf	TGTGTACGAGATGGTGTTCCTGTTCA
	LIP3-RTr	CATGGTCAGCTTGTTGGTGATCTTGG
Lipase 4 (*LIP4*)	LIP4-RTf	CTCGCCAAAGAATCCTCAACACTCTG
	LIP4-RTr	TACGGGACGAGCAAACTTTCATCAAC
Lipase 5 (*LIP5*)	LIP5-RTf	ACTTCGGTTGTTACCTACGGCTACTC
	LIP5-RTr	CAGTAATACCTGCAACACACAGTCCG
Lipase 6 (*LIP6*)	LIP6-RTf	GCTCTTCTTTATCCAGGACCGCTTTG
	LIP6-RTr	GTCACCCACAATGTTCTGGATCTGGT

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การตรวจสอบหาความเข้มข้นของ Tween ที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อ *M. furfur*

เนื่องจากเชื้อ *Malassezia* เป็นเชื้อที่ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้เอง ในการเลี้ยงเชื้อจึงจำเป็นต้องเติมไขมันลงไปในอาหาร เพื่อหาปริมาณไขมันที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. furfur* จึงทำการเติม Tween 60 หรือ Tween 80 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2% (v/v) โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30ºC ที่ 150 rpm ระยะเวลา 11 วัน และทำการวัดค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ทุก 24 ชั่วโมง

2. การเลี้ยงเชื้อ *M. furfur*

จากการตรวจสอบหาความเข้มข้นของ Tween ที่เหมาะสม พบว่า Tween 60 ความเข้มข้น 0.5% เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ จึงกำหนดให้ขั้นตอนนี้ใช้ความเข้มข้นดังกล่าวเลี้ยงเชื้อ เตรียมเชื้อโดยการทำ pre-culture นำเชื้อ *M. furfur* ประมาณ 1 loop ลงใน YPD broth ปริมาตร 2 ml ในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30ºC ที่ 150 rpm ระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำเชื้อไปล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง วัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm เติมเชื้อที่เตรียมไว้ลงในอาหาร YPD broth ในฟลาสก์ ซึ่งแต่ละชุดการทดลองได้ปรับ

ค่า pH ต่าง ๆ (pH 2-10) ไว้แล้ว โดยกำหนดให้เชื้อเริ่มต้นมีค่า OD = 0.02 (ประมาณ 5 x 10^5 cells/ml) ให้ชุดควบคุม (control) คือ YPD broth (pH 6.4) ที่ไม่ได้ปรับค่า pH ใด ๆ ด้วย HCl หรือ NaOH นำเชื้อแต่ละชุดการทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 30ºC ที่ 150 rpm ระยะเวลา 9 วัน ทำการวัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer และสังเกตลักษณะสัณฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทุก 24 ชั่วโมง

3. การสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ได้สกัด total RNA โดยเริ่มจากการเก็บเซลล์จากแต่ละชุดการทดลองของวันที่ 2 และ 6 นำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำไปผสมกับน้ำยา TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., USA) โดยทำตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ หลังจากนั้นนำ total RNA ที่ได้เป็นแม่พิมพ์เพื่อสังเคราะห์ cDNA ต่อด้วยชุด Kit ของ ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, Japan) โดยทำตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เก็บรักษาไว้ที่ -20ºC และนำไปใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการทำ RT-PCR และ qPCR ต่อไป

4. การทำ RT-PCR และ qPCR

ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LIP1-6* ได้ใช้เทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.1 โดยผสม cDNA เข้ากับ 2X Taq Master Mix (Vivantis) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ และนำไปทำ PCR โดยเริ่มต้นจาก (1) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ (2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที (3) annealing ที่อุณหภูมิ 52-55°C เป็นเวลา 30 วินาที (4) extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยซ้ำขั้นตอน (2)-(4) จำนวน 40 รอบ และ (5) final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ที่ได้จาก RT-PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ตัวอย่างจาก RT-PCR ปริมาตร 5 µl ผสมกับ loading dye 1 µl และ UltraPower™ DNA stain 1 µl หยอดลงในช่องบน 1% agarose gel แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ electrophoresis chamber ใช้ความต่างศักย์ที่ 70 V ใน 1X TAE buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ agarose gel ไปตรวจผลภายใต้แสง UV โดยบันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation

ในการตรวจหาปริมาณการแสดงออกของยีน ได้ใช้เทคนิค qPCR โดยใช้ไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.2 โดยผสม cDNA เข้ากับ Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs) และทำขั้นตอนต่าง ๆ ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ คำนวณค่า relative expression จากผลการทำ qPCR เป็นจำนวน 3 ครั้ง

ทั้ง RT-PCR และ qPCR ใช้ยีน beta-tubulin (β*tub*) ของ *M. furfur* CBS 1878^T (GenBank, accession number KC573799) เป็น reference gene

5. การสกัดและเตรียม extracellular protein และ intracellular protein

ในการเตรียม extracellular protein ของเชื้อ *M. furfur* ดูดเซลล์ที่เลี้ยงในแต่ละชุดการทดลองของระยะเวลาต่าง ๆ ปริมาตร 1 ml มาปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ที่ 2000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่มี extracellular protein ไปกรองด้วย 0.22 µm membrane filter (Merck Millipore, USA) เก็บ supernatant ที่ปราศจากเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับการทดลองต่อไป

สำหรับการสกัด intracellular protein ของเชื้อ *M. furfur* นำส่วน pellet ที่มีเซลล์จากขั้นตอนที่กล่าวข้างต้นมาล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม PEB ปริมาตร 400 µl และ glass beads ตามความเหมาะสมลงไป นำเซลล์ไป vortex ให้แตก นำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ที่ 15000 g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เซลล์ที่ไม่แตกและเศษซากเซลล์ตกตะกอน นำส่วนใสที่มี intracellular protein ไปกรองด้วย protein ไปกรองด้วย 0.22 µm membrane filter ตามด้วย Amicon® Ultra Centrifugal Filters (molecular weight cutoff of 30 kDa) (Merck Millipore, USA) วัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ด้วย Bradford reagent (Bio-Rad, USA) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ ปรับความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละตัวอย่างให้เท่ากับ 1mg ml^{-1} ด้วย PEB เก็บตัวอย่างโปรตีนที่ปราศจากเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับการทดลองต่อไป

6. การทดสอบ lipase activity

ในการตรวจหา lipase activity ประยุกต์จากวิธีการของ Juntachai et al. [16] โดยใช้หลักการที่เอนไซม์ lipase จะไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) 4-NPP ให้กลายเป็น 4-NP ที่สามารถตรวจสอบด้วย spectrophotometry ได้ ซึ่งในสารละลายสำหรับปฏิกิริยา 100 µl ประกอบด้วยตัวอย่างโปรตีน 10 µl และ assay mixture 90 µl ที่ปรับความเข้มข้นสุดท้ายของสารต่าง ๆ ดังนี้ 0.5 M 4-NPP, 0.5% Triton X-100, 100 mM citrate buffer (pH 5.0) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 1 M Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 200 µl ตามลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำสารละลายไปวัดค่าการการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่น 405 nm (ใช้ 4-NP เป็นสารมาตรฐานในการหาความเข้มข้นของ 4-NP ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ 4-NPP)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้โปรแกรม SPSS statistics for Windows (IBM, New York, USA) คำนวณ โดยกำหนดให้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY