การศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำพลาสมิด pEGFP-β_1AR เข้าสู่เซลล์ HEK-293 โดยใช้ FuGENE 6

นายอภิสิทธิ์ พาบุญ
นางสาวปิยาภรณ์ ดวงจินดา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2554

DETERMINING THE OPTIMAL CONDITIONS FOR TRANSFECTION OF pEGFP-β_1AR PLASMID INTO HEK-293 CELLS BY USING FuGENE 6

MISTER APISIT PABOON

MISS PIYAPHORN DOUNGJINDA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT

OF THE REQUIREMENT FOR

THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY

FACULTY OF PHARMACY

MAHIDOL UNIVERSITY

2011

โครงการพิเศษ

เรื่อง การศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำ

พลาสมิด pEGFP-β_1AR เข้าสู่เซลล์ HEK-293 โดยใช้ FuGENE 6

.....

(นายอภิสิทธิ์ พาบุญ)

.....

(นางสาวปิยภรณ์ ดวงจินดา)

.....

(อาจารย์ศุภโชค มั่งมูล)

บทคัดย่อ
การศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำพลาสมิด pEGFP-β_1AR เข้าสู่เซลล์ HEK-293 โดยใช้ FuGENE 6

อภิสิทธิ์ พาบุญ, ปิยาภรณ์ ดวงจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษา :ศุภโชค มั่งมูล
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ : พลาสมิด pEGFP-β_1AR, เซลล์ HEK-293, FuGENE6, ประสิทธิภาพในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

การนำเอาพลาสมิด (plasmid) เข้าสู่เซลล์โดยใช้ transfection reagents จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสม (optimal condition) ได้แก่ ปริมาณพลาสมิด, จำนวนเซลล์และปริมาณ transfection reagents เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ (maximum transfection efficiency) การทดลองครั้งนี้ เราใช้พลาสมิด pEGFP-β_1AR ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีนของ β_1-adrenergic receptor (β_1AR) ที่เชื่อมต่อด้วย GFP (green fluorescent protein), เซลล์ HEK-293 และ FuGENE6 transfection reagent ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำ GFP-β_1AR เข้าสู่เซลล์ HEK-293 โดยนับจำนวนเซลล์ที่มี GFP-β_1AR อยู่บนผิวเซลล์ โดยการใช้กล้อง fluorescent microscope ส่องดูเซลล์ที่ติดสีเขียว (green fluorescent color) จากการทดลองพบว่าปริมาณที่เหมาะสมของเซลล์ HEK-293 คือ 1×10^5 cells/35mm glass bottom dish และอัตราส่วนที่เหมาะสมของปริมาณพลาสมิด pEGFP-β_1AR ต่อ FuGENE6 คือ พลาสมิด 1 μg ต่อ FuGENE6 1 μl นอกจากนี้เรายังศึกษาการทำงานของ GFP-β_1AR ว่ามีการทำงานที่ปกติหรือไม่โดยการกระตุ้น GFP-β_1AR ด้วย isoproterenol (βAR agonist) หลังจากกระตุ้นรีเซปเตอร์ด้วย isoproterenol พบว่า GFP-β_1AR ที่อยู่บนผิวเซลล์จะ internalize เข้าสู่ cytosol เราเรียกขบวนการนี้ว่า “receptor internalization” ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้พบว่า GFP-β_1AR ที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์ยังสามารถทำงานได้เป็นปกติที่สภาวะเหมาะดังกล่าวข้างต้น

Abstract

DETERMINING THE OPTIMAL CONDITIONS FOR TRANSFECTION OF pEGFP-β_1AR PLASMID INTO HEK-293 CELLS BY USING FuGENE 6

Apisit Paboon, Piyaphorn Doungjinda

Project advisor: SupachokeMangmool

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Key word: pEGFP-β_1AR plasmid, HEK-293 cells, FuGENE6, transfection efficiency

The bringing of plasmid (containing foreign DNA) into the cells by using any transfection reagents must be required to find the optimal conditions such as amount of plasmid, number of cells, and volume of transfection reagent for obtaining the maximum transfection efficiency. In this experiment, we used pEGFP-β_1AR plasmid, human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells, and FuGENE6 transfection reagent to find the optimal conditions for bringing GFP-β_1AR into and expressing in HEK-293 cells. We count the cells that express GFP-β_1AR as shown in green color when monitorcells with fluorescent microscope. We found that the proper amount of cells is $1x10^5$ cells per 35 mm glass bottom dish and the optimal proportion between pEGFP-β_1AR and FuGENE6 is plasmid 1 μg per FuGENE6 1 μl that provided the highest transfection efficiency. In addition, we also monitor the functional property of GFP-β_1AR by stimulation this receptor with isoproterenol (βAR agonist). After stimulation with isoproterenol, the GFP-β_1ARs that expressed on plasma membrane are internalized into the cytosol. This process called receptor internalization. We found that GFP-β_1ARs which transfected into HEK-293 cells at optimal conditions are function normally.