การศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำพลาสมิด pDsRed-AT_1R เข้าสู่เซลล์ HEK-293 โดยใช้ FuGENE6

นางสาวเพียงขวัญ ใจแก้ว
นางสาวรัชนก ฉัตรปราการ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2555

DETERMINING THE OPTIMAL CONDITIONS FOR TRANSFECTION OF pDsRed-AT_1R PLASMID INTO HEK-293 CELLS BY USING FuGENE6

MISS PIANGKWAN JAIKAEW
MISS RATCHANOK CHARTPRAKARN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

2012

โครงการพิเศษ

เรื่อง การศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำ

พลาสมิด pDsRed-AT_1R **เข้าสู่เซลล์** HEK-293 **โดยใช้** FuGENE 6

.....

(นางสาวเพียงขวัญ ใจแก้ว)

.....

(นางสาววัชนก ฉัตรปราการ)

.....

(อาจารย์ศุภโชค มั่งมูล)

บทคัดย่อ
การศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำพลาสมิด pDsRed-AT_1R เข้าสู่เซลล์ HEK-293 โดยใช้ FuGENE 6

เพียงขวัญ ใจแก้ว, รัชนก ฉัตรปราการ
อาจารย์ที่ปรึกษา :ศุภโชค มั่งมูล
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ : พลาสมิด pDsRed-AT_1R, เซลล์ HEK-293, สภาวะที่เหมาะสมในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

การนำพลาสมิดpDsRed-AT_1R เข้าสู่เซลล์HEK-293เป็นกระบวนการที่เรียกว่า Transfection ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาการทำงานของยีนและการแสดงออกของโปรตีน เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ซึ่งต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลเหล่านี้ได้แก่ จำนวนเซลล์ ปริมาณพลาสมิด ชนิดของ transfection reagent เป็นต้น ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเอา pDsRed-AT_1R เข้าสู่เซลล์ HEK-293 โดยที่เราจะนับจำนวนเซลล์ที่มีpDsRed-AT_1R อยู่บนผิวเซลล์โดยการใช้กล้อง fluorescent microscope ส่องดูเซลล์ที่ติดสีแดง การทดลองในขั้นแรกได้กำหนดปริมาณของ FuGENE 6 transfection reagent 2 µl และปริมาณ pDsRed-AT_1R plasmids 1 µg ให้คงที่ พบว่ามีจำนวน DsRed-AT_1R expressing cells มากที่สุดในตัวอย่างที่มีจำนวนเซลล์ HEK-293 ที่ $0.5x10^5$ cells/dish ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 293.67 เซลล์ หลังจากนั้นทำการหาปริมาณ FuGENE 6 transfection reagent และ ปริมาณ pDsRed-AT_1Rplasmids ที่เหมาะสมโดยกำหนดให้จำนวนเซลล์ HEK-293คงที่ที่ $0.5x10^5$ cells/dish ผลการวิจัยพบว่ามีจำนวน DsRed-AT_1R expressing cells มากที่สุดในตัวอย่าง FuGENE 6 2 µl, pDsRed-AT_1R 1 µgเฉลี่ยเท่ากับ 333.50cells ภายหลังจากนำพลาสมิดเข้าภายในเซลล์พบว่า DsRed-AT_1R จะอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Angiotensin II ซึ่งเป็น agonist จะเกิดการเคลื่อนที่ของรีเซปเตอร์จากผิวเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ เรียกกระบวนการนี้ว่า internalization การศึกษานี้สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมคือจำนวนเซลล์ HEK-293 เท่ากับ $0.5x10^5$ cells/dish ปริมาณ FuGENE 6 เท่ากับ 2 µl และปริมาณ pDsRed- AT_1R เท่ากับ 1 µgการทดลองนี้เป็นจุดเริ่มต้นในการวิจัยและค้นคว้าหาสาระสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของ AT_1R

‘

Abstract

DETERMINING THE OPTIMAL CONDITIONS FOR TRANSFECTION OF pDsRed-AT_1R PLASMID INTO HEK-293 CELLS BY USING FuGENE 6

Piangkwan Jaikaew, Ratchanok Chatprakarn

Project advisor:SupachokeMangmool

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Key word: pDsRed-AT_1R plasmid, HEK-293 cell, optimal condition for transfection, FuGENE 6

Transfection is the process which introducing various macromolecules into an eukaryotic cell. The highest transfection efficiency requires considered optimal conditions such as number of cells, amounts of plasmid and volume of transfecting reagent. In this experiment, we used pDsRed-AT_1R plasmid, human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells, and FuGENE6 transfection reagent to determine the optimal conditions for bringing DsRed-AT_1R into and expressing in HEK-293 cells. The DsRed-AT_1R expressing cells (red color) were detected and counted via fluorescent microscope. The volume of FuGENE6 and the amount of pDsRed-AT_1R plasmid were fixed as 2 µl and 1 µg, respectively in the initial step. We found that the maximum amount of DsRed-AT_1R expressing cells (293.67 cells) shown in $0.5x10^5$ HEK-293 cells per 35-mm dish. By using the $0.5x10^5$ cells/dish, the highest number of DsRed-AT_1R expressing cells (333.50 cells) is found when using 2 µl of FuGENE 6 and 1 µg of pDsRed-AT_1R plasmid. When Angiotensin II binding to DsRed-AT_1R, the receptors that expressed on plasma membrane were internalized into the cytosol. This process called receptor internalization. In conclusion, the optimal conditions which are number of cells, volume of FuGENE6 , amount of pDsRed- AT_1R for transfecting are $0.5x10^5$ cells/dish, 2 µl and 1 µg, respectively. This study provides a data which may be used in researching AT_1R functions as well as the efforts to analyze the AT_1R affecting substances.