บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1. ตัวอย่างเชื้อ *Leptospira* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง (virulent strains) ที่พบในประเทศไทย 2 strains ได้แก่ *Leptospira bratislava,* และ *Leptospira icterohaemorrhagiae* ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (non-virulent strain) คือ *Leptospira patoc* ได้รับความเอื้อเฟื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

2. สายสะดือมนุษย์ ได้รับความเอื้อเฟื้อจากฝ่ายสูติศาสตร์-นรีเวชกรรม ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยเก็บจากทารกที่เกิดจากมารดาที่ตั้งครรภ์ครบกำหนดและสุขภาพดีที่มาคลอด ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

3. สารเคมี

Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Germany)

Bovine serum albumin; BSA (Sigma, USA)

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Sigma, USA)

Dimethyl sulfoxide; DMSO (Sigma, USA)

Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris medium; EMJH (Difco,)

Fetal bovine serum; FBS (Gibco, USA)

Human endothelial-SFM basal growth medium with L-glutamine (Gibco, USA)

Lipopolysaccharides; LPS (Sigma, USA)

Medium 199 (M199) with Earle's balanced salts, 0.68 mM L-glutamine, without sodium bicarbonate (HyClone, USA)

Potassium chloride (KCl) (Sigma, USA)

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Sigma, USA)

Sodium dodecyl sulfate sodium salt; SDS ($C_{12}H_{25}O_4Sna$) (Sigma, USA)

Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Sigma, USA)

Sodium chloride (NaCl) (Sigma, USA)

Trypsin-EDTA (Sigma,USA)

Penicillin-Streptomycin (HyClone, USA)

4. วัสดุวิทยาศาสตร์

75-cm^2 cultured flasks (Corning, USA)

24 well cultured plate (Costar, USA)

96-well cultured plate (Greiner, Germany)

15, 50 ml plastic tube (Costar, USA)

Extension tube; 3F-ET2527 (Terumo, Japan)

Syringe (Terumo, Japan)

Syringe filter; Ministart (Satorius, Germany)

Sterile set (ถาด, กรรไกร)

5. ครุภัณฑ์

Laminar flow

CO_2 incubator

Inverted phase contrast microscope; Olympus (Japan)

Darkfield microscope; Olympus (Japan)

Microplate reader

pH meter

Refrigerate centrifuge; Hettich

Water bath

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira*

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* ทำในห้องปฏิบัติการของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นำเชื้อ *Leptospira* ที่เก็บไว้เป็น stock reference ในตู้เก็บเชื้อ -80 °C โดยนำ stock reference มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 10% EMJH (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris medium) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 คือ เชื้อ *Leptospira* 1 ส่วน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ส่วน (ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อดูรายละเอียดในภาคผนวก) เลี้ยงในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 10 ml

หลายๆ หลอดใน incubator ที่อุณหภูมิ 30°C เลี้ยงไปจนกระทั่งได้ปริมาณเซลล์ที่มีความหนาแน่น 10^8 cells/ml ปริมาตร 100 ml หลังจากนั้นใส่เชื้อ *Leptospira* ปริมาตร 100 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 400 ml ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 1 ลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากยิ่งขึ้น ตรวจดูเชื้อที่เพาะเลี้ยงทุก 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (darkfield microscope) กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อดูการเพิ่มจำนวนเซลล์ ลักษณะของเซลล์ และไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตได้ความหนาแน่นของเซลล์ 10^8 cells/ml ทำการเปรียบเทียบโดยวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี McFarland standard ในการเตรียมเชื้อสำหรับการทดลอง ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* แต่ละสายพันธุ์ให้ได้ความหนาแน่นดังกล่าวปริมาตร 5 ลิตร จึงจะเพียงพอต่อการทดลอง

2. **การสกัด** outer membrane protein (OMP)

วิธีสกัด outer membrane protein ของ *Leptospira* ใช้วิธีของ Bey et al.[47] โดยนำ leptospira cells ที่เพาะเลี้ยง 5 ถึง 7 วัน ที่ 28-30°C จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่น 10^8 cells/ml แบ่ง cultured cells มาครั้งละ 200 ml centrifuge ภายใต้อุณหภูมิ 4°C ที่ 17,000 รอบต่อนาที 30 นาที แยก supernatant ทิ้ง แล้ว resuspend pellet ที่ได้ใน 1 M NaCl 8 ml เพื่อให้น้ำเกลือเข้าไปในเซลล์ ใช้เวลาประมาณ 3-5 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะของเซลล์โดย dark-field microscopy จนกระทั่งได้เซลล์มีลักษณะกลม จึงนำไป centrifuge อีกครั้ง ภายใต้อุณหภูมิ 4°C ที่ 17,000 รอบต่อนาที 30 นาที แยก supernatant ทิ้ง แล้ว resuspend pellet ที่ได้ในน้ำกลั่น 8 ml เพื่อให้เซลล์กระจายออกจากกัน การแยกผนังชั้นนอกของเซลล์ใช้ 0.04% sodium dodecyl sulfate (ละลายในน้ำ) ปริมาณ 200 ml เพื่อละลาย (solubilize) ส่วน outer membrane เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) นาน 3-4 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะของเซลล์ที่แตกออกโดย darkfield microscope เมื่อเซลล์แตกออกเป็นชิ้นละเอียดแล้วจึง centrifuge 5,000 รอบต่อนาที แยก supernatant นำไปทำ dialysis ด้วยถุง cellulose.โดยใช้น้ำกลั่น เพื่อแยก solvent sodium dodecyl sulfate ออก ซึ่งใช้เวลา 3 วัน ต้องเปลี่ยนน้ำกลั่นวันละ 2 ครั้ง นำส่วนที่เหลือในถุง dialysis กรอง ผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 μm filtrate ที่ได้นำไปทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization ส่วนของ outer membrane protein ที่แยกได้นำไปวัดความเข้มข้นของโปรทีนด้วยวิธี Bradford protein assay

Leptospira cultured .ใน EMJH

(5-7 วัน ที่ 28-30°C, cell density 10^8 cell/ml)

↓ Centrifuge 17000 rpm, 30 นาที, 4 $^{\circ}$C

Cultured cell 200 ml

↓ Centrifuge 17000 rpm, 30 นาที, 4 $^{\circ}$C

resuspend ใน 1 M NaCl 200 ml

treat cell suspension with 0.04% sodium dodecyl sulfate (SDS) 200 ml

↓ Centrifuge 5000 rpm

resuspend ใน distilled water 10 ml

↓

Treat cell suspension with 0.04% sodium dodecyl sulfate (SDS) 200 ml

↓

Dialysis SDS จาก supernatant ด้วย distilled water 3 วัน

↓

Supernatant กรองผ่าน 0.45 μm membrane filter

↓

Freeze ให้แข็งที่อุณหภูมิ -20°C 2 วัน

Lyophilized

รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดโปรทีนผนังชั้นนอก (OMP) ของเชื้อ *Leptospira*

3. การวัดปริมาณโปรทีนของ outer membrane protein

ใช้ Bio-Rad protein assay kit ตามวิธีการของ Bradford[48] ซึ่งใช้หลักการเติมสี Coomassie Brillient Blue G-250 ลงไปในสารละลายโปรทีน การจับกันของ Coomassie Brillient Blue G-250 กับโปรทีนทำให้เกิดสีฟ้า วัดความเข้มข้นของสีด้วย spectrophotomether วัดค่า OD ที่ wavelength 595 nm แล้วเทียบกับ standard curve

การเตรียม protein standard curve และการวัดปริมาณโปรทีนในตัวอย่าง (sample)

1. เตรียมสารละลาย stock bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 mg/ml ทำโดยละลาย BSA 0.02 g ในน้ำกลั่น 20 ml แบ่งเก็บเป็น 10 หลอด และเก็บที่ -20°C

2. เตรียมสารละลาย working standard BSA ในน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 μg/ml

3. เติมน้ำกลั่น 1 ml ลงในตัวอย่าง OMP แต่ละขวดที่จะวัดปริมาณโปรทีน ทำให้สารละลายของ OMP เจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น (นั่นคือ ตัวอย่าง 10 μl ต่อน้ำกลั่น 90 μl) ใช้น้ำกลั่นเป็น blank

4. เตรียมสารละลาย Bio-Rad dye โดย Bio-Rad dye 1 ส่วน ต่อน้ำกลั่น 4 ส่วน

5. ดูดสารละลาย working standard BSA, blank และ sample ปริมาณ 10 μl ลงใน 96-well plate แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 well (duplicate)

6. เติมสารละลาย Bio-Rad dye 190 μl ลงในทุก well ผสมสารละลายทั้งสองโดยใช้ microplate mixer ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

7. นำไปอ่านค่า absorbance ที่ 595 nm (อ่านค่าภายใน 1 ชั่วโมง) ด้วยเครื่อง microplate reader

4. การศึกษาองค์ประกอบของโปรทีนผนังชั้นนอกของเชื้อ *Leptospira* โดยใช้ SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

เตรียมแผ่น SDS-PAGE (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) เตรียมตัวอย่าง OMP โดยละลายในน้ำกลั่น (1 ต่อ 9) ผสมตัวอย่าง OMP ที่เจือจางแล้วกับ loading buffer อัตราส่วน 1 ต่อ 1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที นำไปหยอดบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยใช้ปริมาณตัวอย่าง 5, 8 และ 10 ไมโครลิตร และหยอด standard molecular weight marker ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (20-119 kilodalton) บนแผ่นเจลเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งเราทราบว่า OMP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32-40 kilodalton (kDa) ทำการแยกสารโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา ประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลที่ได้ไปแช่ในสี Coomassie Brillient Blue G-250 โดยทิ้งไว้ 1 คืน (18 ชั่วโมง) พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องเขย่าตลอดเวลา นำแผ่นเจลที่ย้อมสีแล้ว

ไปล้างสีออกด้วย destaining solution (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) จะเกิดแถบสีของโปรทีนเปรียบเทียบกับ marker ซึ่งจะสามารถประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรทีนต่างๆ ใน OMP ได้

5. **การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผนังหลอดเลือด** (Cultured human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)

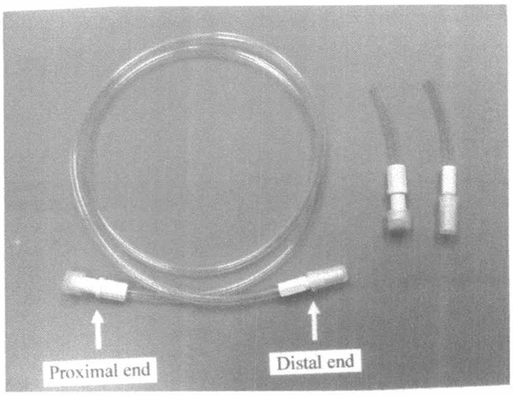
การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS in EC:M199)

ก่อนนำ Fetal bovine serum (FBS) ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ต้องทำการ inactivated ในส่วนของ complement ที่มีอยู่ใน serum ซึ่งอาจทำให้ cell lysis หรือการทำงานผิดปกติ[49] ทำโดยนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับ endothelial cell จะทำการผสม Human endothelial-SFM basal medium และ medium 199 (M199) (pH 7.4) ในอัตราส่วน 1:1 (vol/vol) ซึ่งมี 10% fetal bovine serum, penicillin (100 u/ml), streptomycin (100 μg/ml) และ L-glutamine (2mM) เก็บในตู้เย็น 4°C และใช้ภายใน 1 เดือน

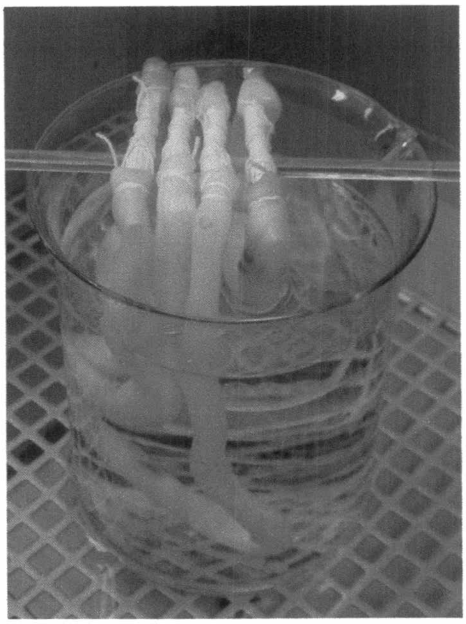
การแยก (isolate) เซลล์บุผนังหลอดเลือด

เก็บสายสะดือจากภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โดยได้รับอนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และหัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา แยกและเพาะเลี้ยง endothelial cells โดยใช้วิธีของ Maruyama[50], Jaffe et al.[51] และปรับปรุงให้เหมาะสมโดยคณะวิจัย[52] สายสะดือที่นำมาใช้ควรมีความยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร มัดปลายทั้งสองข้าง แช่ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ที่ 4°C ควรใช้ภายใน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกเซลล์ล้างทำความสะอาดอีกด้วยน้ำเกลือ และ 70% แอลกอฮอล์ จากนั้นตัดที่ปลายข้างหนึ่งของสายสะดือ รีดเลือดออกใส่ extension tube (รูปที่ 7) ที่เส้นเลือดดำ (umbilical vein) (extension tube ใช้เฉพาะส่วนปลายทั้ง 2 ข้าง จะตัดออกเหลือความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร) ผูกให้แน่น ปลายอีกข้างหนึ่งของสายสะดือก็ทำเช่นเดียวกัน ล้างเลือดที่อยู่ภายในเส้นเลือดดำด้วย phosphate buffer saline (PBS) (ภาคผนวก) จากนั้นใส่ 0.5% trypsin-EDTA in PBS นำปลายทั้ง 2 ข้าง ของ extension tube มาต่อกัน นำไป incubate ใน 0.9% NaCl ที่ 37°Cเป็นเวลา 15 นาที (รูปที่ 8) จากนั้นใช้ 10% FBS in M199 ฉีดไล่ trypsin-EDTA ที่อยู่ในสายสะดือออก ใส่ในหลอด 50 ml ปริมาณที่ใช้จะเท่ากับ trypsin-EDTA ที่ใส่เข้าไป นำไปปั่นที่ 250 g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ออก เติม serum-free M199 เพื่อ resuspend pellet cells นำปั่นที่ 250g ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเท supernatant ทิ้ง ส่วน pellet cells เติมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ (10% FBS in EC:M199) โดย

เติม 12 ml ต่อ 2 cord นำ cell suspension ใส่ใน 75-cm^3 culture flask (12 ml/flask) เพาะเลี้ยงใน incubator ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 ที่ 37 °C หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยเอาอาหารเดิมออก ล้างด้วย PBS ตรวจดูลักษณะเซลล์ภายใต้ phase contrast microscope เปลี่ยนอาหารครั้งต่อไปทุก 2-3 วัน จนกว่าเซลล์เต็ม flask ทำการตรวจยืนยันว่าเซลล์ที่ได้เป็น endothelial cell โดยเลี้ยงเซลล์ให้เกาะบนแผ่น slide แล้วนำไปย้อมโดยใช้ Avidine-Biotin Complex (ABC) method และใช้ factor VIII-AG antibody เพื่อตรวจ factor VIII ซึ่ง typical สำหรับ endothelial cell



รูปที่ 8 ลักษณะ extension tube



รูปที่ 9 การ incubate สายสะดือเพื่อแยก endothelial cell

การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Subculture of endothelial cell)

เมื่อเซลล์เต็ม (confluent) ประมาณ 5-7 วัน เอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS จากนั้นเติม trypsin-EDTA 6 ml เพื่อย่อยเซลล์ที่เกาะอยู่ออก นำไปใส่ incubator ประมาณ 5 นาที ตรวจดูว่าเซลล์หลุดออกหมดด้วย phase contrast microscope เติม 10% FBS in M199 เพื่อไปยับยั้งการทำงานของ trypsin-EDTA ซึ่งจะทำลายเซลล์ได้ นำ cell suspension ใส่ในหลอด 50 ml ไปปั่นที่ 250 g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ออก และล้างอีกครั้งด้วย 10% FBS in M199 นำไปปั่นที่ 250 g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที pellet cells จากที่ย่อยออกมาจาก 1 flask (12 ml) จะเพิ่มจำนวนได้เป็น 2 flasks เพาะเลี้ยงใน incubator ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 ที่ 37 °C

การเลี้ยงเซลล์บน plate ที่มี 24 หลุม (24-well plate) สำหรับใช้ในการทดลอง ทำโดยนำเซลล์ที่เลี้ยงใน flask ที่เป็น passage ที่ 2 มาแยกและ suspend ใน 10% FBS in M199 เหมือนวิธีข้างต้น subculture ลง 22 หลุม ของ 24-well plate ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ 60,000 เซลล์ต่อหลุม

6. **ศึกษาผลของ outer membrane protein extract ของ *Leptospira* ใน HUVEC**

ศึกษาผลของ outer membrane protein extract ของ *Leptospira* ใน cultured human umbilical vein endothelial cells ใช้ cultured HUVEC ที่ passage 2-3 อายุ 5-7 วัน ใน serum-free medium 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 5 กลุ่ม คือ

<u>กลุ่ม 1</u> กลุ่มควบคุม (negative control) โดยใช้ serum free medium ซึ่งใช้ละลาย OMP

<u>กลุ่ม 2</u> ให้ LPS (positive control) ความเข้มข้น 0.1 μg/ml

<u>กลุ่ม 3</u> ให้ outer membrane protein extract จาก *L.bratislava* ที่ละลายใน medium ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 μg/ml

<u>กลุ่ม 4</u> ให้ outer membrane protein extract จาก *L.icterohaemorrhagiae* ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 μg/ml

<u>กลุ่ม 5</u> ให้ outer membrane protein extract จาก non-virulent strain ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 μg/ml

ในแต่ละ plate จะทำการทดลองดังแสดงในตารางข้างล่าง ทำการทดลองในระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แต่ละจุดเวลาทำซ้ำ 3 plate รวมทั้งหมดมี 9 plates

1 Positive Control LPS 0.1 µg/ml	2 Positive Control LPS 0.1 µg/ml	3 Negative Control Serum-free medium	4 Negative Control Serum-free medium	5	6
7 *L. bratislava* 0.1 µg/ml	8 *L. bratislava* 0.1 µg/ml	9 *L. icterohaemo rrhagiae* 0.1 µg/ml	10 *L. icterohaemo rrhagiae* 0.1 µg/ml	11 *L. patoc* 0.1 µg/ml	12 *L. patoc* 0.1 µg/ml
13 *L. bratislava* 0.3 µg/ml	14 *L. bratislava* 0.3 µg/ml	15 *L. icterohaemo rrhagiae* 0.3 µg/ml	16	13 *L. patoc* 0.3 µg/ml	14 *L. patoc* 0.3 µg/ml
19 *L. bratislava* 0.5 µg/ml	20 *L. bratislava* 0.5 µg/ml	21 *L. icterohaemo rrhagiae* 0.5 µg/ml	22 *L. icterohaemo rrhagiae* 0.5 µg/ml	23 *L. patoc* 0.5 µg/ml	24 *L. patoc* 0.5 µg/ml

วิธีการทดลอง

1. ดูด medium เดิมในแต่ละหลุมทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ดูด PBS ทิ้ง จากนั้นเติม serum-free medium 0.5 ml ในกลุ่มที่ 1 และ 0.45 ml ในกลุ่มที่ 2-4
2. เติม LPS 0.05 ml ในกลุ่มที่ 2 ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 µg/ml
3. เติม OMP extract 0.05 ml ในกลุ่มที่ 3, 4 และ 5 ตามความเข้มข้นที่จะศึกษา
4. บ่มไว้ภายใต้ 5% CO_2 ที่ 37 °C ที่เวลา 6, 12, และ 24 ชั่วโมง
5. หลังจากบ่มไว้ 6 ชั่วโมง จะนำ 3 plate มาเก็บตัวอย่างโดยนำไป centrifuge ที่ 1200 รอบต่อนาที 5 นาที แยก cell-free supernatant medium โดยแบ่งเก็บในหลอด biofreeze 2 หลอด เก็บที่ -70 °C จนกว่าจะทำการวัดปริมาณของ nitric oxide และ TNF-α
6. หลังจากบ่มไว้ 12 และ 24 ชั่วโมง จะเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 5

7. **การวัด** cell viability

ใช้หลักการที่เซลล์มี respiration ใน mitochondria โดยใช้ 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)[53] โดยนำ cultured HUVEC ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน 96-well plate ที่ได้ทำการทดลองกับ OMP ของเชื้อ *Leptospira* 3 สายพันธุ์ ในความเข้มข้นและระยะเวลาเหมือนกับการทดลองในข้อ 6 ดูด medium ทิ้ง เติม 0.2 mg/ml MTT 200 µl ลงไป ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ใน incubator ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 ที่ 37 °C จากนั้นดูดเอา supernatant ออก และเติม DMSO 100 µl วัดค่า absorbance ที่ wavelength 595 nm โดย microplate reader

1 Positive Control LPS 0.1 µg/ml	2 Positive Control LPS 0.1 µg/ml	3 Negative Control Serum-free medium	4 Negative Control Serum-free medium	5	6
7 *L. bratislava* 0.1 µg/ml	8 *L. bratislava* 0.1 µg/ml	9 *L. icterohaemorrhagiae* 0.1 µg/ml	10 *L. icterohaemorrhagiae* 0.1 µg/ml	11 *L. patoc* 0.1 µg/ml	12 *L. patoc* 0.1 µg/ml
13 *L. bratislava* 0.3 µg/ml	14 *L. bratislava* 0.3 µg/ml	15 *L. icterohaemorrhagiae* 0.3 µg/ml	16 *L. icterohaemorrhagiae* 0.3 µg/ml	13 *L. patoc* 0.3 µg/ml	14 *L. patoc* 0.3 µg/ml
19 *L. bratislava* 0.5 µg/ml	20 *L. bratislava* 0.5 µg/ml	21 *L. icterohaemorrhagiae* 0.5 µg/ml	22 *L. icterohaemorrhagiae* 0.5 µg/ml	23 *L. patoc* 0.5 µg/ml	24 *L. patoc* 0.5 µg/ml

วิธีการทดลอง

1. ดูด medium เดิมในแต่ละหลุมทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ดูด PBS ทิ้ง จากนั้นเติม serum-free medium 0.5 ml ในกลุ่มที่ 1 และ 0.45 ml ในกลุ่มที่ 2-4
2. เติม LPS 0.05 ml ในกลุ่มที่ 2 ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 µg/ml
3. เติม OMP extract 0.05 ml ในกลุ่มที่ 3, 4 และ 5 ตามความเข้มข้นที่จะศึกษา
4. บ่มไว้ภายใต้ 5% CO_2 ที่ 37 °C ที่เวลา 6, 12, และ 24 ชั่วโมง
5. หลังจากบ่มไว้ 6 ชั่วโมง จะนำ 3 plate มาเก็บตัวอย่างโดยนำไป centrifuge ที่ 1200 รอบต่อนาที 5 นาที แยก cell-free supernatant medium โดยแบ่งเก็บในหลอด biofreeze 2 หลอด เก็บที่ -70 °C จนกว่าจะทำการวัดปริมาณของ nitric oxide และ TNF-α
6. หลังจากบ่มไว้ 12 และ 24 ชั่วโมง จะเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 5

7. การวัด cell viability

ใช้หลักการที่เซลล์มี respiration ใน mitochondria โดยใช้ 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)[53] โดยนำ cultured HUVEC ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน 96-well plate ที่ได้ทำการทดลองกับ OMP ของเชื้อ *Leptospira* 3 สายพันธุ์ ในความเข้มข้นและระยะเวลาเหมือนกับการทดลองในข้อ 6 ดูด medium ทิ้ง เติม 0.2 mg/ml MTT 200 µl ลงไป ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ใน incubator ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 ที่ 37 °C จากนั้นดูดเอา supernatant ออก และเติม DMSO 100 µl วัดค่า absorbance ที่ wavelength 595 nm โดย microplate reader

8. **การวัดปริมาณ nitric oxide**

ทำโดยวัดปริมาณ nitrite production[54] โดยใช้ Griess reagent ทำใน 96-well plate โดยpipette ตัวอย่างที่จะตรวจ 62.5 μl ใส่ลงใน well เติม 0.14 M KH_2PO_4 100 μl FAD 6.25 μl และ 12.5 mM NADPH 2 μl ทิ้งไว้ 3 นาที เติม 4.25 μl ของ nitrate reductase ความเข้มข้น 3.5 Unit/ml เขย่าด้วยเครื่องตามแนวราบ เป็นเวลา 10 นาที เติม 250 μl ของ Griess reagent ซึ่งประกอบด้วย 0.1% naphthylenediamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% H_3PO_4 นำไปวัดค่า OD ที่ wavelength 540 nm

การเตรียม standard curve ทำโดย เตรียม $NaNO_3$ ใน serum free medium ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 μmole/L

9. **การวัดปริมาณ TNF-α**

ใช้ Immunoassay kit ชนิด human TNF-α Ultrasensitive ของ Biosource International, USA ซึ่งเป็น solid phase Enzyme linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) antibody ที่เฉพาะเจาะจงกับ hTNF-α จะถูก coat ไว้บนหลุมของ plate ตัวอย่างที่จะตรวจ ตลอดจน standard ที่ทราบปริมาณ และ control specimen ที่ใส่ในแต่ละหลุม เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ในครั้งแรก hTNF-α antigen จะจับกับ antibody ที่ตำแหน่งหนึ่งและจับกับ biotinylate antibody ใน solution เป็นตำแหน่งที่ 2 หลังจากแยก secondary antibody ออกแล้ว จะเติม streptavidine-peroxidase enzyme เพื่อไปจับกับ biotinylated antibody จะได้เป็น four-member sandwich ที่สมบูรณ์ บ่มครั้งที่ 2 แล้วล้าง streptavidine-peroxidase enzyme ส่วนเกิน (unbound enzyme) ออก เติม substrate solution เพื่อไปทำปฏิกิริยากับ bound enzyme เกิดเป็นสี ซึ่งความเข้มของสีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ hTNF-α ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ตรวจ วัดความเข้มของสีที่ 450 nm

การวัดผลและการเสนอผลการวิจัย

หาองค์ประกอบของ leptospira outer membrane protein เชิงคุณภาพ วัดปริมาณโปรทีนของ leptospira outer membrane วิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide ในรูป nitrite หาปริมาณ TNF-α แสดงผลเป็น ค่า mean $\pm$ SE

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยใช้สถิติ One way ANOVA และ Unpaired Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$)

หาค่า mean $\pm$ SE ของปริมาณหรือ percentage change เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม