บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

เก็บพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ลำต้นใต้ดินของว่านสาวหลง และเร่วหอม จากงานสวนพฤกษศาสตร์ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา และระบุชนิดของพืชโดย ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร จากนั้นนำลำต้นใต้ดินของพืชมาล้างด้วยน้ำประปาแล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งแห้ง ก่อนนำใบแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วชั่งน้ำหนักใบพืชหลังจากที่ปั่นได้ทั้งหมด

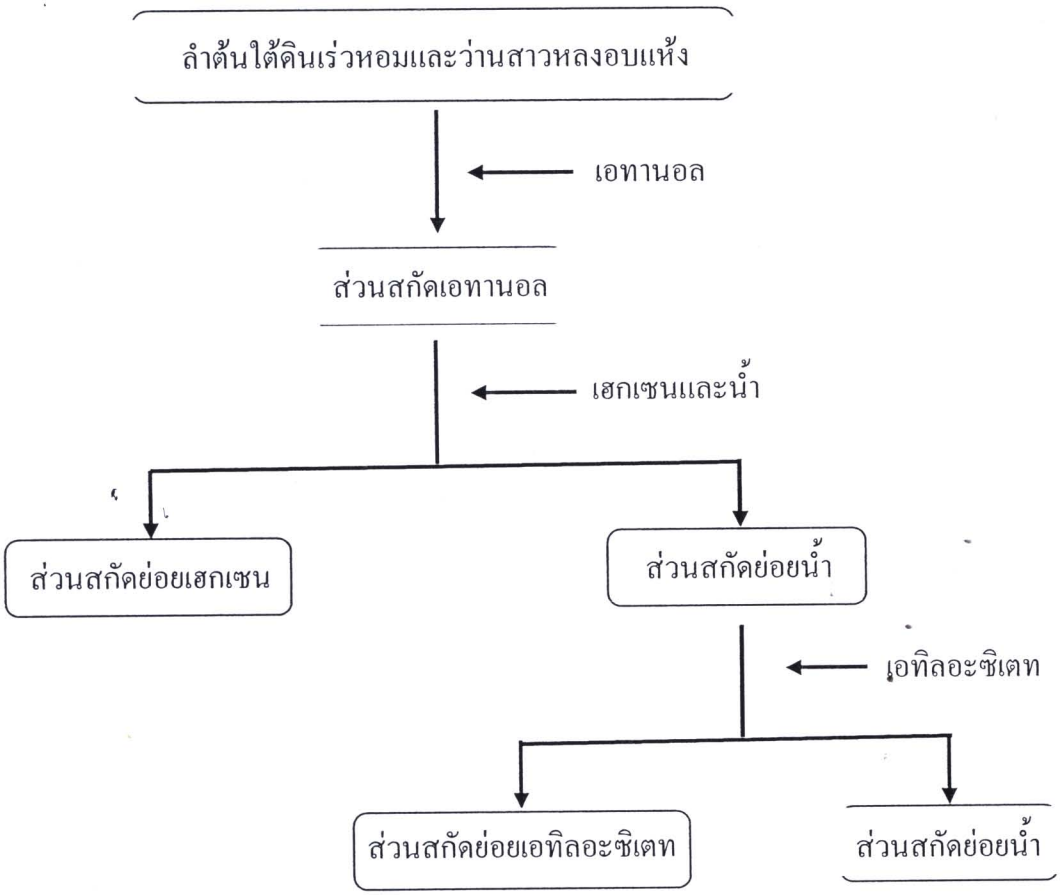
2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

นำส่วนลำต้นใต้ดินที่บดละเอียดแช่ในสารละลายเอทานอลในอัตราส่วน 1 L ต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม กรองส่วนสกัดที่ได้ แล้วนำผงของลำต้นใต้ดินมาสกัดซ้ำด้วยเอทานอลซ้ำ 2 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) และเครื่องดูดสุญญากาศ (vacum pump) ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ จากนั้นสกัดแยกส่วนสกัดเอทานอลด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ ได้เป็นส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำตามลำดับ และนำแต่ละชั้นที่แยกได้มาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำที่ได้ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านต้านอักเสบของส่วนสกัด

2.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% FBS (ปริมาตร/ปริมาตร) และนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี CO_2 5 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเกือบเต็มพื้นผิวของภาชนะ ทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะ โดยการขูดเก็บเซลล์ (cell scraping)

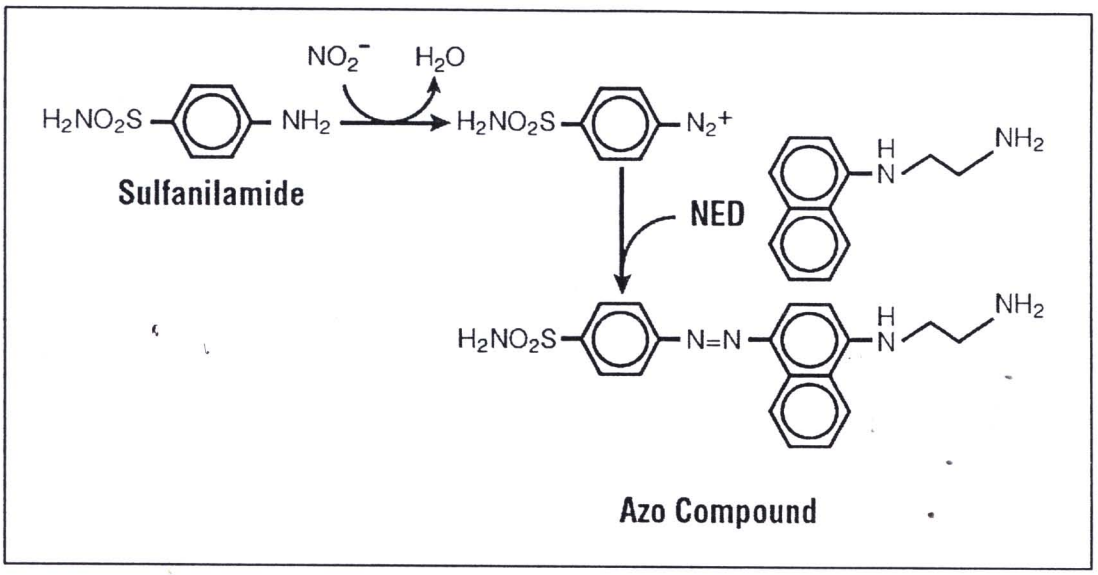


รูปที่ 2-1 แผนผังการสกัดแยกส่วนของเร่วหอมและว่านสาวหลงโดยสรุป

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์โดยปฏิกิริยา Griess

ปฏิกิริยา Griess เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไนไตรท์เป็นผลผลิตที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นมาจากเอนไซม์ iNOS โดยในขั้นตอนแรก ไนไตรท์จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรดได้เป็นสารตัวกลางที่เป็นเกลือ diazonium ซึ่งสารตัวกลางนี้จะทำปฏิกิริยากับ N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrocholide (NED) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น azo compound เป็นสารสีชมพูที่มีความเสถียร (รูปที่ 2-2) ดังนั้นปริมาณไนไตรท์จึงเป็นดัชนีที่บ่งบอกกิจกรรมของเอนไซม์ iNOS ทำการทดลองโดยการแบ่งเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5x10^5$ เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 μg/mL ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 μL ทำปฏิกิริยา

กับสารละลาย Griess [1% N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrocholide และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน 100 µL และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ที่ความเข้มข้น 0-50 µM



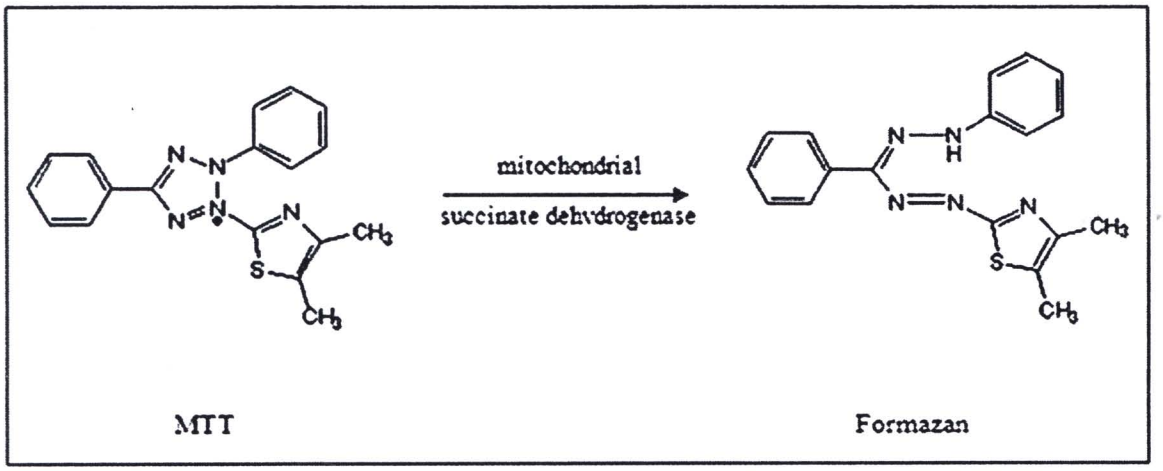
รูปที่ 2-2 ปฏิกิริยา Griess

(ที่มา : www.promega.com/tbs/tb229/tb229.pdf)

2.3.3 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดย MTT assay

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5x10^5$เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/mL) จำนวน 10 µL แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO จำนวน 500 µL และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ซึ่ง MTT สามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง (รูปที่ 2-3) ปริมาณ formazan จะมีความสัมพันธ์ตรงกับจำนวนเซลล์

$$\% \text{ การมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม}} \times 100$$



รูปที่ 2-3 ปฏิกิริยาการรีดักชันของ MTT

(ที่มา : www.mclab.com/product.php?productid=19249&cat=91)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัด

2.4.1 การทดสอบการกำจัดอนุมูล DPPH

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Nagai และคณะ (2005) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.2 mM ปิเปตส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 50 µL และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลทนาน 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (microplate reader, VERSAMAX, USA) โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และบีเอทที (BHT) เป็นสารควบคุมแบบบวก ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากสมการ

$$\% \text{ การกำจัดอนุมูล DPPH} = A_a - (A_b - A_c)/A_a \times 100$$

โดยที่ A_a คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ประกอบด้วยเมทานอล และสารละลาย DPPH

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบที่ประกอบด้วยส่วนสกัดและสารละลาย DPPH

A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบที่ประกอบด้วยส่วนสกัดและเมทานอล

2.4.2 การทดสอบ reducing power

การทดสอบ reducing power หรือ ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay ทำโดยวิธีที่รายงานโดย Chan และคณะ (2007) นำส่วนสกัดปริมาตร 1 mL ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 M, pH 6.6) ปริมาตร 2.5 mL และสารละลาย 1% $K_3Fe(CN)_6$ ปริมาตร 2.5 mL ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 10% TCA ปริมาตร 2.5 mL เขย่าผสมกันก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนบนปริมาตร 2.5 mL ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 2.5 mL และสารละลาย 0.1% $FeCl_3$ ปริมาตร 0.5 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 700

นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท แสดงความสามารถในการรีดิวซ์ ในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (GAE) ต่อกรัมของส่วนสกัด โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.4.3 การทดสอบฤทธิ์การคีเลท Fe^{2+}

การขจัดโลหะทรานซิชันโดยการใช้คีเลทโลหะ เช่น Fe^{2+} เป็นอีกกลไกที่ใช้ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระทั้งนี้เพราะโลหะทรานซิชันมีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูล โดยปฏิกิริยา Fenton และ Harber Weiss การทดสอบฤทธิ์การคีเลท Fe^{2+} ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Kosem และคณะ (2007) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้ นำส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 200 µL ผสมกับสารละลาย $FeCl_2$ ที่ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 10 µL ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลท จากนั้นเติมสารละลาย ferrozine ที่ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 20 µL จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้ EDTA เป็นสารควบคุมแบบบวก คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferrozine-Fe^{2+} จากสมการ

$$\% \text{ การคีเลท } = A_a - (A_b - A_c)/A_a \times 100$$

โดยที่ A_a คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วย $FeCl_2$ และ ferrozine

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วย $FeCl_2$, ferrozine และส่วนสกัด

A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วย $FeCl_2$ และส่วนสกัด

2.4.4 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound)

วิเคราะห์ปริมาตรสารประกอบฟีนอลรวมโดยดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Mongkolsilp และคณะ (2004) ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัด คำนวณจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้ เตรียมสารละลายกรดแกลลิกในเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 mg/mL เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL ตามลำดับ ในปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 0.5 mL สารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือส่วนสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาตร 125 µL และสารละลาย Folin Ciocalteu's reagent ปริมาตร 125 µL เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติม 7% sodium carbonate ปริมาตร 1.25 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 mL เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายใส่ในไมโครเพลท ปริมาตร 200 µL และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท แสดงปริมาณสารฟีนอลรวมเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (GAE) ต่อส่วนสกัด 1 กรัม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 8 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 245675
เลขเรียกหนังสือ

2.5 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีของผิวหนัง การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำโดยวิธีที่รายงานโดย Chan และคณะ (2008) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้ ละลายส่วนสกัดพืชตัวอย่างใน 50 % DMSO นำส่วนสกัดที่ความเข้มข้น0.5 mg/mL ปริมาตร 40 µL ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 6.8) ปริมาตร 80 µL เอนไซม์ไทโรซิเนส (31 Units/mL) ปริมาตร40 µL และสารละลาย L-DOPA (2.5 mM) ปริมาตร 40 µL ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลท จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้กรดโคจิก (kojic acid) เป็นสารควบคุมแบบบวก ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสมการ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส = $A_a - (A_b - A_c)/A_a \times 100$

โดยที่ A_a คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ใส่ 20 % DMSO แทนส่วนสกัด

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบที่มีส่วนสกัดและเอนไซม์ไทโรซิเนส

A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีส่วนสกัดแต่ไม่มีเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.6 การสกัด RNA

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. ($1x10^6$ เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ก่อนดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการขูดเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย Tri reagent จำนวน 1 mL ก่อนทำการสกัด RNA ทั้งหมดของเซลล์ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (MRC) โดยมีวิธีดังนี้ เติมคลอโรฟอร์มจำนวน 0.2 mL และผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพา-นอลจำนวน 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดบรรจุ RNA เข้าเครื่อง heat block ที่อุณหภูมิ 55 °C เพื่อระเหย เอทานอล ก่อนเติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 µL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ RNA ละลายได้ดีขึ้น ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A_{260} เท่ากับ 40 µg/mL ของ RNA

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ปฏิกิริยาสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ประกอบด้วย RNA จำนวน 2 μg, 3U AMV reverse transcriptase, 5X buffer [250 Tris-HCl (pH 8.3), 250mM KCl, 50mM $MgCl_2$, 2.5mM spermidine และ 50mM DTT], 0.083 mM oligo $(dT)_{15}$ primer, 0.67 mM dNTPs, 20 U RNase inhibitor และเติมน้ำปราศจาก RNase และ DNase ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 μL สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 42°C นาน 45 นาที และ 99 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้โดยเติม 1x NEB buffer, dNTPs ตัวละ 0.2 mM เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1U และไพร์เมอร์ที่จำเพาะสำหรับ mRNA ของ iNOS และ β-actin โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ในตารางที่ 1 จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมซอฟแวร์ BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR

Target	Primer sequences	Product size (bp)	Accession no.
iNOS	5'-CTAAGAGTCACCAAAATGGCTCCC-3'(sense) 5'-ACCAGAGGCAGCACATCAAAGC-3' (antisense)	775	NM010927.2
β-actin	5'-ATGGTGGGAATGGGTCAGAAGGAC-3'(sense) 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3'(antisense)	513	NM007393.2

2.8 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm.($1x10^6$ เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (1X) PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4] ที่เย็น 1 ครั้ง ก่อนเติม จากนั้นขูดเก็บเซลล์ใน protein lysis buffer (100 mM HEPES (pH 7.5), 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.5% Triton X-100 และ protease inhibitors mixture (Complete mini, Roche, Germany) และทำเซลล์ให้แตกด้วยการ sonication บนน้ำแข็ง ขูดเก็บ

เซลล์ลงในหลอดทดลอง 1.5 mL ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g นาน 5 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic acid (BCA)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของสารตัวอย่างด้วยวิธี BCA ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Pierce) โดยนำสารตัวอย่าง 2 µL และน้ำกลั่น 8 µL ผสมกับสารละลาย working BCA (อัตราส่วนของสารละลาย A:B เท่ากับ 50:1) จำนวน 200 µL แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จะได้สารเชิงซ้อนสีม่วงที่เสถียรและละลายน้ำได้ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท และคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่ปริมาณ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 µg โดยแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm และแกน x เป็นค่าปริมาณของโปรตีน

2.10 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

เตรียม SDS-polyacrylamide gel ที่มี separating gel 10% และ stacking gel 4% จากนั้นหยอดโปรตีนลงในปริมาณเท่ากันหลุมละ 60 µg ลงในเจลและผ่านกระแสไฟฟ้าใน (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) SDS] ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วย้ายแถบโปรตีนลงบนแผ่น PVDF ใน transfer buffer [(192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) methanol] ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 25 โวลต์ และที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน ก่อนทำการบ่ม membrane ด้วยสารละลาย blocking [5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) nonfat dry milk ในบัฟเฟอร์ TBS-T] ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย mouse anti-iNOS antibody (1:2500) ที่ละลายในสารละลาย blocking ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน หรือสารละลาย mouse anti ß-actin (1:5,000) ที่ละลายในสารละลาย blocking เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้าง membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase secondary antibodies conjugated ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วน 1:5,000 สำหรับ iNOS, และ 1:10,000 สำหรับ ß-actin ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane บ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ECL) นาน 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์ในห้องมืด วิเคราะห์แถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของ iNOS และ ß-actin กับโปรตีนมาตรฐาน

2.11 การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการเคลื่อนที่ของ NF-KB เข้าสู่นิวเคลียส

NF-KB เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ดังนั้นจึงทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ NF-KB/p65 ใน nuclear extract โดยวิธี Western blot analysis และเปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้จากสภาวะที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ กับสภาวะที่เติมสารสกัด วิธีแยกโปรตีนจาก nuclear extract อธิบายไว้ใน Srisook และคณะ (2011)

2.12 การวิเคราะห์ปริมาณโพรสตาแกลดิน E2 โดยปฏิกิริยา Griess

แบ่งเซลล์แมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5x10^5$ เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 μg/mL ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ 500 μL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณโพรสตาแกลดิน E2 ที่ถูกผลิตในแมคโครฟาจ และหลั่งออกจากเซลล์มาสะสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ การวิเคราะห์ทำโดยใช้ ELISA kit (R&D system, USA.) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ

2.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองที่อิสระต่อกัน ทำ 3 ซ้ำ และคำนวณค่า IC_{50} โดยการวิเคราะห์แบบถดถอย สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยจากข้อมูลที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่ม เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป และใช้ Student's t test สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันของ 2 กลุ่มข้อมูล โดยใช้โปรแกรม SPSS 15.0