บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

งานวิจัยนี้ มีจุดประสงค์ที่จะหาสารจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส หรือยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรส เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง โดยหลักการแล้ว สารที่ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส จะทำให้ไม่มีการต่อปลายเทโลเมียในเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวที่จำกัด และทำให้เซลล์แก่ (Senescence) หรือ ตายในที่สุด จากหลักการนี้ จะเห็นได้ว่า สารที่ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส จะไม่ทำลายเซลล์มะเร็งอย่างฉับพลัน แต่จะทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัดอีกต่อไป ดังนั้น วิธีการหาสารที่ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส จึงต่างจากการหาสารฆ่าเซลล์มะเร็งโดยทั่วไป ที่ใช้ผลจากการเป็นพิษต่อเซลล์ในระยะเวลาอันสั้น เป็นวิธีการคัดกรองในขั้นแรก

กลุ่มวิจัยเรา ต้องการที่จะหาสารตัวใหม่จากพืช ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส หรือยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรสในเซลล์มะเร็ง จากการผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ต่อเทโลเมอเรส มีโครงสร้างที่หลากหลาย และยังไม่มีการค้นคว้ามากนักในพืช ทางกลุ่มวิจัยเราจึงใช้วิธีการเลือกชนิดพืชแบบสุ่มมาทำการสกัด โดยเริ่มจากการสกัดหยาบโดยสารละลายที่มีขั้วแตกต่างกันสี่ชนิด ได้แก่ Hexane, Ethyl acetate, Acetone, และ Methanol (ตารางที่ 1) เมื่อพบว่าสารสกัดหยาบส่วนใด มีฤทธิ์ที่ต้องการ จึงจะนำไปสกัดให้บริสุทธิ์ เพื่อนำมาทดสอบอีกที จนท้ายที่สุด จะได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ที่ต้องการ ซึ่งจะถูกนำไปศึกษาหาสูตรโครงสร้างของสารนั้นๆต่อไป

ในงานวิจัยนี้ นอกจากเราได้ทำการทดสอบ สารสกัดจากพืชที่เราได้สกัดเองโดยตรงแล้ว ยังมีสารสกัดและสารบริสุทธิ์บางชนิดที่ได้จากนักวิจัยท่านอื่น พืชแต่ละชนิดอยู่ในระยะของการทดสอบที่แตกต่างกัน บางชนิดเพิ่งจะสกัดได้ บางชนิดได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แล้ว บางชนิดได้ผ่านการทดสอบเบื้องต้น ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน hTERT ในระดับ RNA โดยวิธี RT-PCR และไม่มีผลยับยั้ง จึงได้หยุดการทดสอบต่อไป ในบรรดาสารสกัดทั้งหมด เราพบว่าสารสกัดจากขิง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน hTERT ทั้งในระดับ RNA และระดับโปรตีน ในรายงานฉบับนี้ จึงมีผลวิจัยของสารสกัดขิงมากที่สุด ซึ่งจะเป็นแนวทางในการทำการทดสอบสารสกัดพืชชนิดอื่นต่อไป

ในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส เราได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของ TRAP assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์หาการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส แต่ประมาณปลายเดือน ต.ค. 2550 ได้มีบทความเรื่อง "Reevaluation

of Telomerase Inhibition by Quadruplex Ligands and Their Mechanisms of Action" โดย Anne De Cian และคณะ [56] โดยรายงานวิจัยฉบับนี้มีบทสรุปที่ว่า ไม่ควรใช้ TRAP assay ในการหาผลการยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสโดย G-quadruplex ligand เนื่องจากสารเหล่านี้ สามารถยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ทำให้ได้ผลบวกลวง ทางผู้วิจัยได้เสนอให้ใช้วิธี Direct telomerase inhibition แต่วิธีการนี้ จำเป็นต้องใช้เทโลเมอเรสจำนวนมาก ที่ได้จากการผลิตเทโลเมอเรสโดยการสอดใส่พลาสมิดสองชนิดที่จำเป็นต่อการสร้างเทโลเมอเรสลงในเซลล์ HEK293T ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยเราจึงได้ทำการขอพลาสมิดทั้งสอง และได้รับการอนุเคราะห์พลาสมิด pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR จาก Dr. Joachim Lingner, Swiss Institute for Experimental Cancer Research เราได้ทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดในแบคทีเรีย ทดสอบว่าเป็นพลาสมิดที่ต้องการจริงโดยวิธี PCR และได้ทำการสอดใส่พลาสมิดทั้งสองชนิดลงในเซลล์ HEK293T และได้ตรวจดูการแสดงออกของเทโลเมอเรส โดยวิธี RT-PCR และ Western blotting analysis จนถึงขณะนี้เรายังอยู่ในขั้นตอนการผลิตเทโลเมอเรส และกำลังจะพัฒนาระบบการคัดกรองหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสที่ทำได้รวดเร็ว ในขณะนี้ เราจึงยังไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืช ในการยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส

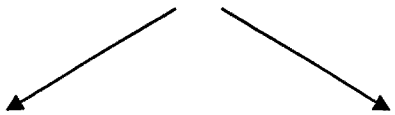
ในรายงานวิจัยฉบับนี้ จะได้รายงานผลการทำงานในส่วนต่างๆ โดยมีภาพรวมดังแสดงในผังการดำเนินการวิจัยในหน้าต่อไป

ผังวิธีดำเนินการวิจัย

สกัดสารจากพืชด้วยสารละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน

(Hexane, Ethyl acetate, Acetone, Methanol)

หรือ สารบริสุทธิ์



ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส

ขั้นตอน

1. การจัดตั้งระบบการคัดกรองหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส โดยวิธี TRAP assay
2. การผลิตเทโลเมอเรสโดยการแสดงออกระยะสั้นของยีนเทโลเมอเรสที่อยู่ในพลาสมิด เพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเทโลเมอเรสโดยตรง
3. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดตัวอย่างในการยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรส

ขั้นตอน

1. ทดสอบความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันของสารสกัดตัวอย่างต่อเซลล์มะเร็งปอด โดยวิธี Sulforhodamine B assay
2. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดตัวอย่างในการยับยั้งการแสดงออกของยีน hTERT ในระดับ RNA โดยวิธี RT-PCR
3. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดตัวอย่างในการยับยั้งการแสดงออกของยีน hTERT ในระดับโปรตีน โดยวิธี Western blotting analysis

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 2.1: คุณสมบัติของสารละลายที่ใช้กันทั่วไป

(จาก http://www.erowid.org/psychoactives/chemistry/chemistry_info5.shtml)

Solvent	formula	boiling point (°C)	melting point (°C)	density (g/mL)	solubility in water (g/100g)	relative polarity
water	H_2O	100.00	0.00	0.998	M	1.000
glycerin	$C_3H_8O_3$	290	17.8	1.261	M	0.812
ethylene glycol	$C_2H_6O_2$	197	-13	1.115	M	0.790
methanol	**CH_4O**	**64.6**	**-98**	**0.791**	**M**	**0.762**
diethylene glycol	$C_4H_{10}O_3$	245	-10	1.118	M	0.713
ethanol	C_2H_6O	78.5	-114.1	0.789	M	0.654
acetic acid	$C_2H_4O_2$	118	16.6	1.049	M	0.648
1-propanol	C_3H_8O	97	-126	0.803	M	0.617
1-butanol	$C_4H_{10}O$	117.6	-89.5	0.810	7.7	0.602
2-propanol	C_3H_8O	82.4	-88.5	0.785	M	0.546
acetonitrile	C_2H_3N	81.6	-46	0.786	M	0.460
dimethyl sulfoxide	C_2H_6OS	189	18.4	1.092	M	0.444
dimethyl-formamide	C_3H_7NO	153	-61	0.944	M	0.404
t-butyl alcohol	$C_4H_{10}O$	82.2	25.5	0.786	M	0.389
acetone	**C_3H_6O**	**56.2**	**-94.3**	**0.786**	**M**	**0.355**
2-butanone	C_4H_8O	79.6	-86.3	0.805	25.6	0.327
methylene chloride	CH_2Cl_2	39.8	-96.7	1.326	1.32	0.309
chloroform	$CHCl_3$	61.2	-63.5	1.498	0.8	0.259
diglyme	$C_6H_{14}O_3$	162	-64	0.945	M	0.244
dimethoxy-ethane	$C_4H_{10}O_2$	85	-58	0.868	M	0.231
ethyl acetate	**$C_4H_8O_2$**	**77**	**-83.6**	**0.894**	**8.7**	**0.228**
tetrahydrofuran	C_4H_8O	66	-108.4	0.886	30	0.207
dioxane	$C_4H_8O_2$	101.1	11.8	1.033	M	0.164
methyl *t*-butyl ether	$C_5H_{12}O$	55.2	-109	0.741	4.8	0.148
ether	$C_4H_{10}O$	34.6	-116.3	0.713	7.5	0.117
benzene	C_6H_6	80.1	5.5	0.879	0.18	0.111
toluene	C_7H_8	110.6	-93	0.867	0.05	0.099
p-xylene	C_8H_{10}	138.3	13.3	0.861	I	0.074
carbon tetrachloride	CCl_4	76.7	-22.4	1.594	0.05	0.052
heptane	C_7H_{16}	98	-90.6	0.684	0.01	0.012
hexane	**C_6H_{14}**	**69**	**-95**	**0.655**	**0.014**	**0.009**
pentane	C_5H_{12}	36.1	-129.7	0.626	0.04	0.009
cyclohexane	C_6H_{12}	80.7	6.6	0.779	<0.1	0.006

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 10 ส.ค. 2553
เลขทะเบียน 226404

การทดลองที่ 1: การเตรียมสารสกัดพืช

สมุนไพรที่นำมาศึกษาวิจัยได้รับการตรวจพิสูจน์จากหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม โดยมีเลข BKF no. กำกับหลังชื่อ

◊ **การสกัดขิง** (*Zingiber officinale* Roscoe) (BKF # 118527)

<u>รายละเอียดพืช</u>: ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) เป็นไม้ที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อเรียกอื่นเช่น: ขิงแกลง, ขิงแดง, ขิงเผือก, สะเอ, ขิงบ้าน, ขิงแครง, ขิงป่า, ขิงเขา, ขิงดอกเดียว ลักษณะโดยทั่วไปเป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีนวลมีกลิ่นหอมเฉพาะ แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอประกอบด้วยกาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกัน ใบ เป็นชนิดใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกันเป็นสองแถว ใบรูปหอกเกลี้ยงๆ กว้าง 1.5 – 2 ซม. ยาว 12 – 20 ซม. หลังใบห่อจีบเป็นรูปรางนำปลายใบสอบเรียวแหลม โคนใบสอบแคบและจะเป็นกาบหุ้มลำต้นเทียม ตรงช่วงระหว่างกาบกับตัวใบจะหักโค้งเป็นข้อศอก ดอกสีขาว ออกรวมกันเป็นช่อรูปเห็ดหรือกระบองโบราณ แทงขึ้นมาจากเหง้า ชูก้านสูงขึ้นมา 15 – 25 ซม. ทุกๆ ดอกที่กาบสีเขียวปนแดงรูปโค้งๆ ห่อรองรับ กาบจะปิดแน่นเมื่อดอกยังอ่อนและจะขยายอ้าให้ เห็นดอกในภายหลัง กลีบดอกและกลีบรองกลีบดอก มีอย่างละ 3 กลีบ อุ้มน้ำ และหลุดร่วงไว โคนกลีบดอกม้วนห่อ ส่วนปลายกลีบผายกว้างออกเกสรผู้มี 6 อัน ผลกลม แข็ง โต เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ซม. ส่วนที่นำมาเป็นยา ได้แก่ เหง้าแก่สด ในเหง้าขิงมี น้ำมันหอมระเหยอยู่ประมาณ 1 – 3 % ขึ้นอยู่กับวิธีปลูกและช่วงการเก็บรักษา ในน้ำมันประกอบ ด้วยสารเคมี ที่สำคัญคือ ซิงจิเบอรีน (Zingiberene), ซิงจิเบอรอล (Zingiberol), ไบซาโบลี (bisabolene) และแคมฟีน (camphene) มีน้ำมัน (oleo – resin) ในปริมาณสูง เป็นส่วนที่ทำให้ขิงมีกลิ่นฉุน และมีรสเผ็ด ส่วนประกอบสำคัญ ในน้ำมันชัน ได้แก่ จินเจอรอล (gingerol), โชกาออล (shogaol), ซิงเจอโรน (zingerine)
(* ข้อมูลประมวลจาก วิกิพีเดีย บรรณานุกรมสากล)

<u>วิธีการสกัด</u>: นำเหง้าของขิง ล้างทำความสะอาด แล้วฝานเป็นแผ่นบางๆ นำเข้าตู้อบแห้ง โดยใช้อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากน้ำหนักเริ่มแรก 1 กิโลกรัม ได้น้ำหนักแห้งโดยประมาณ 140 กรัม จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็นผงละเอียด นำผงขิงที่ได้มาสกัดด้วยเครื่อง Soxhelt Apparatus โดยสกัดอย่างเป็นขั้นตอนโดยการเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์จากเฮกเซน , เอทธิลอะซิเตท , อะซิโตน และเมทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดทั้ง 4 ส่วนที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้น และทำการกำจัดตัวทำละลายส่วนเกินออกโดยการระเหย (evaporation) ด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporater ที่

อุณหภูมิเท่ากับจุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์นั้นๆ จากนั้นทำให้แห้งปราศจากสารละลายด้วยเครื่อง lyophilizer จะได้สารสกัดหยาบ (crude extraction) 4 ส่วน ได้สารสกัดในปริมาณ 2.44 กรัม 2.10 กรัม 1.41 กรัม และ 7.16 กรัม ตามลำดับ

◊ **การสกัดจิงโจ้ (*Capparis micracantha* DC.) (BKF # 148869)**

<u>รายละเอียดพืช</u>: จิงโจ้ (*Capparis micracantha*) เป็นไม้ที่อยู่ในวงศ์ Capparaceae มีชื่อเรียกอื่นเช่น แสซอ น้ำนอง น้ำนองหวะ แซ่ม้าลาย ซาลู่ต้น จิงโจ้ และ กินขี้ ลำต้นลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดย่อม ลำต้นโตและมีความสูงประมาณ 1-3 เมตร ผิวลำต้นเป็นกระขาวๆ แตกเป็นระแหง ถ้าอ่อนจะเป็นสีเขียว ใบ สีเขียวและแข็ง ปลายใบเรียวแหลม ความยาว 5-18 เซนติเมตร กว้างประมาณ 3-9 เซนติเมตร ก้านใบมีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร และมีความแหลมอยู่ 2 ข้างใบ ดอก ดอกเป็นเส้นเล็ก ฟู เป็นสีขาว แตกออกมาจากโคนของก้านใบ ตั้งแต่ 1-3 ดอก เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ลักษณะเป็นเส้นสีขาว ฝอยยื่นออกมาข้างนอกปากกระบอกดอก ผล กลมโตเท่าลูกมะนาว ถ้าสุกจะมีสีแดง

<u>วิธีการสกัด</u>: นำส่วนรากของต้นจิงโจ้มาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 200 กรัม ใส่ในเครื่องสัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction, soxhlet apparatus) Buchi รุ่น B811 จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) ที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดซ้ำต่อเนื่องจนกระทั่งไม่มีสารละลายออกมาจากรากแห้งของจิงโจ้แล้ว ปล่อยให้เย็นสักครู่นำสารละลายสารสกัด (crude extract) ขั้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 จากนั้นนำสารสกัดขั้นเฮกเซนที่ได้ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดขั้นเฮกเซน หนัก 1.06 กรัม ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนรากของจิงโจ้ที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้ว มาสกัดต่อไปด้วย ตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต (Ethyl acetate) แอซีโทน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัดหนัก 1.67 กรัม 1.45 กรัม และ 1.79 กรัมตามลำดับ

◊ **การสกัดขันทองพยาบาท (*Suregada multiflorum*) (BKF # 150542)**

<u>รายละเอียดพืช</u>: ขันทองพยาบาท (*Suregada multiflorum*) เป็นไม้ที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อเรียกอื่นเช่น ฮ่อสะพายควาย ยางปลอก และ ขันทองพยาบาทเครือ ลักษณะลำต้นเป็นพันธุ์ไม้ยืนต้นขนาดกลางกิ่งก้านค่อนข้างกลม มีสีเทาเกลี้ยง หูใบเล็ก

หลุดร่วงได้ง่าย ใบ หนาแข็งดกทึบ เป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ๆ รูปหอกแกมขอบขนาน ความยาว 10-16.5 เซนติเมตร กว้างประมาณ 4-8 เซนติเมตร ขอบใบจักรเป็นซี่ฟัน เนื้อใบหนามีลักษณะคล้ายแผ่นหนัง เส้นใบทั้งหมดมีประมาณ 14-16b คู่ ก้านใบมีความยาวประมาณ 9-16 เซนติเมตร เป็นร่องลึก ดอก ออกเป็นช่อกระจายยาวประมาณ 16-18 เซนติเมตร ใบประดับเป็นรูปหอกยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 1-1.5 มิลลิเมตร กลีบรองกลีบดอกมี 5 กลีบเรียงซ้อนกัน ลักษณะคล้ายรูปไข่หรือรูปหอกยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้แยกเป็น 3 อันเชื่อมติดที่โคน อับเรณูค่อนข้างกลม ยอดเกสรตัวเมียจะมี 3 พู รังไข่จะมี 3 ห้อง ผล จะแบนและกว้างประมาณ 18-20 เซนติเมตร ยาวประมาณ 8-10 เซนติเมตร ปลายผลกลมและแข็ง มีเส้นตามยาวไปกับผล เมื่อผลแก่จะแตกตรงปลาย ส่วนเมล็ดมีความกว้างประมาณ 2 มิลลิเมตร ยาว 1 เซนติเมตร

<u>วิธีการสกัด</u>: นำส่วนรากของต้นขันทองพยาบาทมาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 200 กรัม ใส่ในเครื่องสัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction, soxhlet apparatus) Buchi รุ่น B811 จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) ที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดซ้ำต่อเนื่องจนกระทั่งไม่มีสารละลายออกมาจากรากแห้งของจิงโจ้แล้ว ปล่อยให้เย็นสักครู่นำสารละลายสารสกัด (crude extract) ชั้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 จากนั้นนำสารสกัดชั้นเฮกเซนที่ได้ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดชั้นเฮกเซนหนัก 1.45 กรัม ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนรากของจิงโจ้ที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้ว มาสกัดต่อไปด้วย ตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต (Ethyl acetate) แอซีโทน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัดหนัก 1.84 กรัม 1.96 กรัม และ 2.21 กรัมตามลำดับ

◊ **การสกัดหัวยาข้าวเย็น** (*Smilax micro-china*)

<u>รายละเอียดพืช</u>: หัวยาข้าวเย็น (*Smilax micro-china*) เป็นไม้ที่อยู่ในวงศ์ Smilacaceae เป็นไม้เถาแตกแขนงระเกะระกะ มีหนามสั้นทั่วไป เถาขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร ใบเดี่ยวเวียนสลับ รูปรีกว้างหรือรูปไข่กลับกว้าง ด้านบนสีเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างสีนวล มีเส้นโคนใบ 5-7 เส้น ก้านใบสั้น แผ่เป็นกาบหุ้มกิ่ง ดอกเล็กแยกเพศ ออกเป็นช่อซี่ร่มเดี่ยวๆ ตามซอกใบช่อละ 4-8 ดอก ผลสด รูปกลม สีเขียวนวล สุกสีแดง เขตกระจายพันธุ์และถิ่นกำเนิดพบเฉพาะที่จังหวัดเลย เขตพื้นที่โล่งในป่าละเมาะและป่าสน

เขาบริเวณภูเขาหินทราย ที่ระดับความสูง 1200-1500 เมตร ออกดอกและผลเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ เป็นพืชหายาก

วิธีการสกัด: นำส่วนรากของต้นหัวยาข้าวเย็นมาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 200 กรัม ใส่ในเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction, soxhlet apparatus) Buchi รุ่น B811 จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซนที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดซ้ำต่อเนื่องจนกระทั่งไม่มีสารละลายออกมาจากรากแห้งของหัวข้าวยาเย็นแล้ว ปล่อยให้เย็นสักครู่นำสารละลายสารสกัด (crude extract) ขั้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 จากนั้นนำสารสกัดขั้นเฮกเซนที่ได้ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดขั้นเฮกเซนหนัก 1.00 กรัม ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนรากของSYต้นหัวข้าวยาเย็นที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้ว มาสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต (EtOAc) แอซีโทน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัดหนัก 2.03 กรัม 1.74 กรัม และ 1.89 กรัมตามลำดับ

◊ **การสกัดหมากดิบน้ำค้าง (*Hedyotis biflora*) (BKF # 337337)**

รายละเอียดพืช: หมากดิบน้ำค้าง (*Hedyotis biflora*) หรือผักขวง หรือสะเดาดิน เป็นไม้ที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยว ออกตรงข้าม ตัวใบรูปไข่ ดอกเป็นช่อ ตามซอกใบหรือตามยอด ช่อละ 3-40 ดอก ดอกเล็กรูปกรวยปลายแยก 4 ดอก กลีบดอกสีขาวหรือขาวอมม่วง เกสรตัวผู้ติดตรงกลางกรวยดอกหรือต่ำลงไปเล็กน้อย ผลกลมรี ขนาดเล็ก มีสันบางๆสองข้าง ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก พบตามเลือกสวน ริมสนาม หญ้าที่ร่มชุ่มชื้น และที่ว่างทั่วไป

วิธีการสกัด: นำส่วนต้นทั้งหมด (Px) ของหมากดิบน้ำค้าง มาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 200 กรัม ใส่ในเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction, soxhlet apparatus) Buchi รุ่น B811 จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซนที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดซ้ำต่อเนื่องจนกระทั่งไม่มีสารละลายออกมาจากรากแห้งของหมากดิบน้ำค้างแล้ว ปล่อยให้เย็นสักครู่นำสารละลายสารสกัด (crude extract) ขั้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 จากนั้นนำสารสกัดขั้นเฮกเซนที่ได้ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดขั้นเฮกเซนหนัก

1.54 กรัม ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนต้นหมากดิบน้ำค้าง ที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้ว มาสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต (EtOAc) แอซีโทน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัดหนัก 1.86 กรัม 1.21 กรัม และ 1.43 กรัม ตามลำดับ

◊ **การสกัดกระเจียน** (*Polyalthia cerasoides*) (BKF # 151397)

<u>รายละเอียดพืช</u>: กระเจียน (*Polyalthia cerasoides*) หรือมีชื่อเรียกอื่น เช่น ค่าสามซีก แคหาง จันทน์ดง ทรายเด่น พญารากดำ โมดดง สะบันงาป่า หรือ เหลือง อยู่ในวงศ์ Annonaceae เป็นไม้ต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สูง 5-15 เมตร ลำต้นเปลา เปลือกเรียบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปใบหอกแกมรูปขอบขนานและมักเบี้ยว ใบอ่อนมีขนนุ่มทั่วไป ดอกออกเดี่ยวๆหรือเป็นกลุ่มไม่เกิน 3 ดอก ตามง่ามใบและเหนือรอยแผลใบตามกิ่ง มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ กลีบดอกสีเขียวอ่อน เรียงสลับกัน 2 ชั้นชั้นละ 3 กลีบ เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก อยู่ชิดกันแน่นเป็นพุ่มกลม ผลเป็นกลุ่ม อยู่บนแกนตุ้มกลม แต่ละผลป้อมปลายเป็นติ่ง ผลอ่อนสีเขียว แก่จัดเป็นสีแสด ก้านผลเรียวเล็ก โคนก้านติดรวมอยู่บนปลายก้านช่อที่โตเป็นตุ้ม

<u>วิธีการสกัด</u>: นำส่วนรากของกระเจียน มาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 200 กรัม ใส่ในเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction, soxhlet apparatus) Buchi รุ่น B811 จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซนที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดซ้ำต่อเนื่องจนกระทั่งไม่มีสารละลายออกมาจากรากกระเจียน แล้วปล่อยให้เย็นสักครู่นำสารละลายสารสกัด (crude extract) ขั้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 จากนั้นนำสารสกัดขั้นเฮกเซนที่ได้ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดขั้นเฮกเซนหนัก 2.14 กรัม ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนราก กระเจียน ที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้ว มาสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต (EtOAc) แอซีโทน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัดหนัก 2.16 กรัม 1.87 กรัม และ 1.68 กรัมตามลำดับ

◊ **การสกัดไคร้นางนาค** (*Phyllanthus taxodiifolius*) (BKF # 127614)

<u>รายละเอียดพืช</u>: ไคร้นางนาค (*Phyllanthus taxodiifolius*) หรือมีชื่อเรียกอื่น เช่น เสียวน้ำตะไคร้หางสิงห์ เสียวเล็ก หรือ เสียวน้อย อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นไม้พุ่มสูง 1-3 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปขอบขนาน กว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 1-1.5 เซนติเมตร ดอกช่อ

ออกเป็นกระจุกที่ซอกใบ มีดอกย่อยแยกเพสอยู่บนต้นเดียวกัน กลีบรวมสีขาวนวล ผลเป็นผลสด รูปทรงกลม

วิธีการสกัด: นำส่วนทั้งหมดของไคร้นางนาค มาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 200 กรัม ใส่ในเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction, soxhlet apparatus) Buchi รุ่น B811 จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซนที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดซ้ำต่อเนื่องจนกระทั่งไม่มีสารละลายออกมาจากส่วนทั้งหมดของไคร้หางนาค แล้วปล่อยให้เย็นสักครู่นำสารละลายสารสกัด (crude extract) ขั้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 จากนั้นนำสารสกัดขั้นเฮกเซนที่ได้ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดขั้นเฮกเซนหนัก 1.10 กรัม ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนทั้งหมดของไคร้หางนาคที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้วมาสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต (EtOAc) แอซีโทน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัดหนัก 1.66กรัม 1.90 กรัม และ 1.87 กรัมตามลำดับ

◊ **การสกัดกระท่อมเลือด (*Stephania venosa*) (BKF # 40655)**

รายละเอียดพืช: กระท่อมเลือด (*Stephania venosa*) ชื่ออื่น เช่น เปล้าเลือดเครือ; บัวเครือ; บอระเพ็ดยางแดง; บอระเพ็ดพุงช้าง; โกฐหัวบัว; กลิ้งกลางดง (ภาคตะวันตกเฉียงใต้); กระท่อมเลือด (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ); อยู่ในวงศ์ Menispermacea ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ลำต้น เป็นไม้เลื้อย มีน้ำยางสีแดง โคนต้นเป็นหัว เส้นผ่าศูนย์กลางถึง 40 เซนติเมตรใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปไข่แกมสามเหลี่ยม ก้าง 7-12 เซนติเมตร ยาว 6-11 เซนติเมตร ปลายมนหรือเว้าตื้น โคนใบต้นหรือรูปหัวใจ ท้องใบมีขนและคราบสีขาว ก้านใบยาว 5-15 เซนติเมตรดอก เป็นช่อแยกเพศ ช่อดอกตัวผู้เป็นกระจุกรูปซี่ร่มออกที่ซอกใบยาว 4-16 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 6 กลีบ สีเขียวเรียงเป็น 2 วง วงนอกกลีบเลี้ยงรูปใบหอกกลับ วงในกลีบเลี้ยงรูปไข่กลับ กลีบดอก 3 กลีบ สีส้ม รูปสามเหลี่ยมแกมไข่กลับ ยา ว 1.25 มิลลิเมตร ดอกตัวเมียออกเป็นกระจุกแน่นกว่า กลีบเลี้ยงรูปวงรีมี 1 กลีบ กลีบดอกรูปคล้ายโล่ มี 2 กลีบ ผล ผลสดรูปไข่กลับยาว 7 มิลลิเมตร

วิธีการสกัด: นำส่วนรากของกระท่อมเลือด มาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 200 กรัม ใส่ในเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction, soxhlet apparatus) Buchi รุ่น B811 จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซนที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดซ้ำต่อเนื่องจนกระทั่งไม่มีสารละลายออกมาจากรากกระท่อมเลือด แล้ว

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ปล่อยให้เย็นสักครู่นำสารละลายสารสกัด (crude extract) ขั้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 จากนั้นนำสารสกัดขั้นเฮกเซนที่ได้ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดขั้นเฮกเซนหนัก 1.54 กรัม ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนรากของกระท่อมเลือดที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้ว มาสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต (EtOAc) แอซีโทน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัดหนัก 1.97 กรัม 2.90 กรัม และ 2.87 กรัมตามลำดับ

◊ **การสกัดมะคำไก่ (*Drypetes roxburghii*) (BKF # 137689)**

<u>รายละเอียดพืช</u>: มะคำไก่ (*Drypetes roxburghii*) ชื่ออื่น ประคำไก่เป็นไม้ต้น อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ต้นและกิ่งก้านสีขาวนวล กิ่งทอดห้อยลง ใบ เดี่ยว เรียงสลับ รูปรี โคนใบเบี้ยว ใบหนา สีเขียว เป็นมัน ดอก เพศผู้และเมียอยู่ต่างต้นกัน ผล รูปทรงกลม สีขาวอมเทาสุกสีดำ การขยายพันธุ์ เพาะเมล็ด ประโยชน์ ต้นเป็นยาเย็น ขับปัสสาวะ เป็นยาระบายและกระตุ้นความรู้สึกทางเพศ ใบ ผล และเมล็ด กินเป็นยาลดไข้ แก้หวัด และแก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย

<u>วิธีการสกัด</u>: นำส่วนใบและกิ่งแห้งของมะคำไก่ มาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 200 กรัม ใส่ในเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction, soxhlet apparatus) Buchi รุ่น B811 จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซนที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดซ้ำต่อเนื่องจนกระทั่งไม่มีสารละลายออกมาจากใบและกิ่งมะคำไก่ แล้วปล่อยให้เย็นสักครู่นำสารละลายสารสกัด (crude extract) ขั้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 จากนั้นนำสารสกัดขั้นเฮกเซนที่ได้ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดขั้นเฮกเซนหนัก 2.54 กรัม ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนใบและกิ่งของมะคำไก่ที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้ว มาสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต (EtOAc) แอซีโทน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัดหนัก 2.97 กรัม 1.90 กรัม และ 1.83 กรัมตามลำดับ

การทดลองที่ 2: การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสโดยวิธี Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay

TRAP assay เป็นวิธีที่ได้จัดตั้งโดย Kim NW และคณะ ในปี 1994 และได้ถูกใช้เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาหาการทำงานของเทโลเมอเรสที่ได้จากเซลล์มะเร็ง [56] TRAP assay ได้ถูกพัฒนาให้ดีขึ้น มีความถูกต้องมากขึ้น และได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสของสารเคมีต่างๆ [57] วิธีการนี้ เริ่มจากการนำเทโลเมอเรสหยาบที่สกัดจากเซลล์มะเร็ง เทโลเมอเรสจะเติมปลายสายไพรเมอร์ด้วยลำดับเบส TTAGGG ทีละหกเบส (Primer extension) หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณของผลผลิตนี้ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction) หลังจากนั้น จึงนำเอาผลผลิตพีซีอาร์นี้ ไปแยกตามขนาดโดย Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ผลบวกที่ได้ คือการพบการต่อปลายสายไพรเมอร์เป็นลักษณะของแถบขึ้นบันได (Ladder) ที่มีความยาวเพิ่มขึ้นทีละหกนิวคลีโอไทด์

โดยปกติแล้ว การดูการทำงานของ DNA polymerases โดยทั่วไป สามารถทำได้ง่ายภายในขั้นตอนแรก โดยวิธี Primer extension แล้วแยกตามขนาดโดย Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis แล้วสามารถวิเคราะห์ผลได้เลย แต่เนื่องจากปริมาณเทโลเมอเรสในเซลล์มีจำนวนน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถที่จะสกัดได้มากพอที่จะทำให้เห็นผลภายในขั้นตอนเดียวได้ จึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นที่สอง

วิธี TRAP assay ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธี TRAP แบบเก่าเพื่อให้มีความถูกต้องมากขึ้น โดยไม่ให้เกิด PCR product ที่มีความยาวมากกว่า หรือมีความยาวสั้นกว่าผลผลิตเทโลเมอเรสที่มีอยู่จริง (รูปที่ 4) [59] ขั้นตอนของการทดลองนี้แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

การสกัดเอนไซม์เทโลเมอเรสจากเซลล์มะเร็ง

⬇

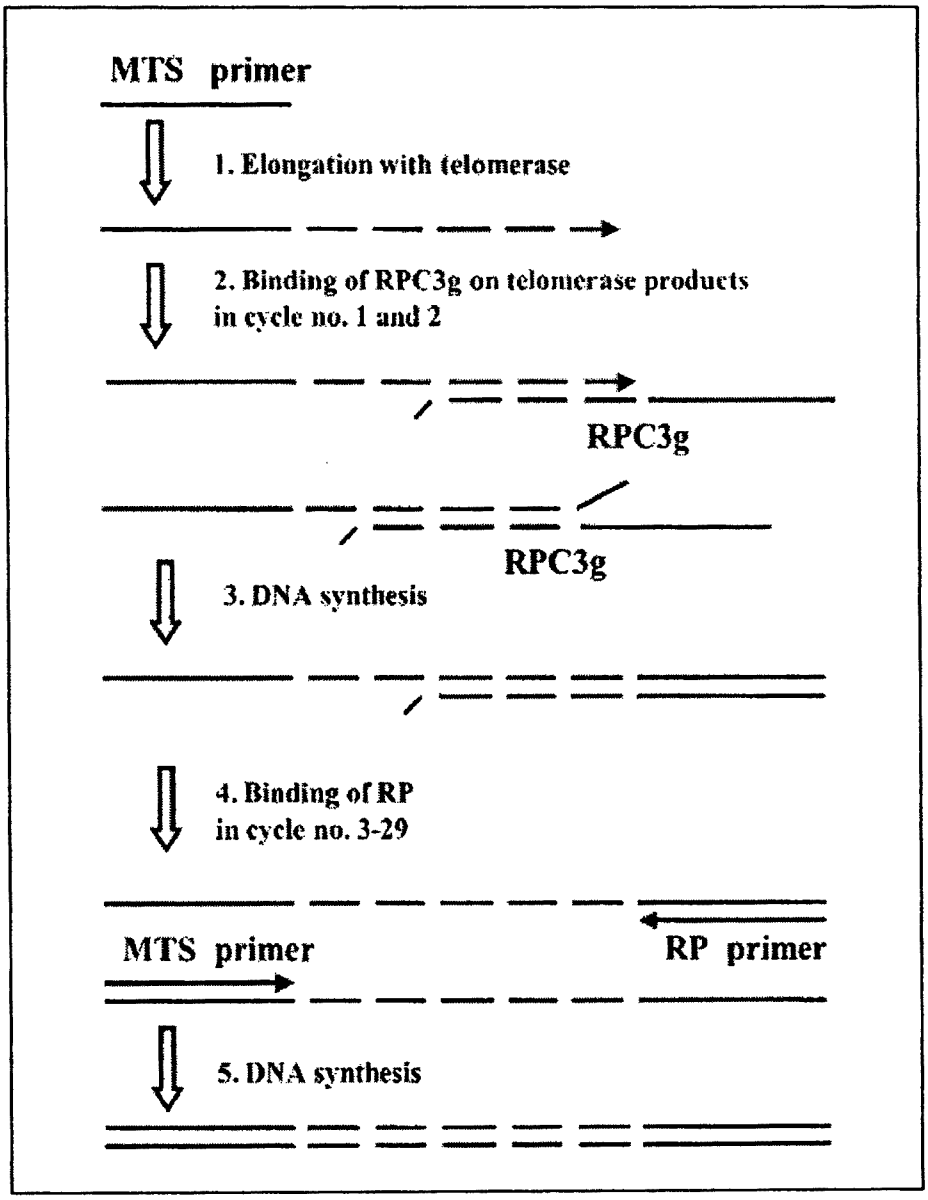
การต่อความยาวของไพรเมอร์โดยการทำงานของเทโลเมอเรส

⬇

การเพิ่มปริมาณ telomerase product โดยวิธีพีซีอาร์

⬇

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) และ PhosphorImaging



รูปที่ 2.1: TRAP Assay **ที่ใช้ในงานวิจัยนี้**

เทโลเมอเรสทำหน้าที่ต่อลำดับเบส (TTAGGG)n ลงบนสายไพรเมอร์ MTS (1) เมื่อเติมโอลิโกนิวคลีโอไทด์ RPC3g พร้อมกับ Taq DNA polymerase ลงไปใน Reaction mixture เฉพาะ Telomerase product ที่ถูกจับคู่โดย RPC3g ที่ตำแหน่งปลายสุดเท่านั้น จึงจะสามารถถูกเติมนิวคลีโอไทด์โดย Taq DNA polymerase ได้ ในขณะที่ Telomerase product ที่ RPC3g ไม่ไปเข้าคู่ที่ตำแหน่งปลายสุด ไม่มีการต่อ เนื่องจากการมี Mismatch ที่ปลาย 3' (2) เช่นเดียวกับ RPC3g ก็ไม่สามารถถูกต่อได้ เนื่องจากการมี Mismatch ที่ปลาย 3' เช่นกัน (3) หลังจากนั้น กระบวนการ PCR จะทำการเพิ่มจำนวนเฉพาะดีเอ็นเอที่ถูกต่อในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ MTS และ RP (4 และ 5)

การสกัดเอนไซม์เทโลเมอเรสจากเซลล์มะเร็ง

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด A549 และ HEK293T ใน 25 cm^2 T-culture flask ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์โดยประมาณ 80 % confluent ทำการหลุดเซลล์โดยใช้สารละลาย 1X trypsin-EDTA ปั่นตกตะกอนเซลล์และปั่นล้างสองรอบด้วย PBS ละลายตะกอนของเซลล์มะเร็งที่ได้ (10^5-10^6 เซลล์) ด้วย 1X CHAPS lysis buffer 200 ไมโครลิตร ที่ประกอบไปด้วย 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA, 5 mM ß-mercaptoethanol 0.5 %, CHAPS, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail และ RNase inhibitior 200 units/ml ผสมเซลล์ให้เข้ากับ lysis buffer ให้ดีด้วย vortex หลังจากนั้น นำสารละลายเซลล์แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะปั่นตกเศษเซลล์ให้ตกที่ 12000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ลงใน eppendrof tubes ที่ทำให้เย็นแล้วที่ต่ำกว่า 0 °C นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวัดหาค่าความเข้มเข้นของโปรตีนโดยใช้ Bradford reagent และนำสารละลายส่วนใสที่ได้นี้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อรอใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การต่อความยาวของไพรเมอร์โดยการทำงานของเทโลเมอเรส (Primer extension)

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (หรือไพรเมอร์) ที่ใช้ในการทดลองนี้ เมื่อได้จากผู้ผลิต ก่อนอื่นต้องนำไปทำให้ให้บริสุทธิ์โดยการแยกบน 20% denaturing polyacrylamide gel eletrophoresis ที่มีในห้องแลปของเราเอง ทำการตัดเจลที่มี primer ทำการ desalting และวัดความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่แยกได้ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 1 และ ขั้นตอนและหน้าที่ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปที่ 4

ตารางที่ 2.2: โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ใน TRAP assay

ชื่อ	ลำดับเบส
MTS	AGCATCCGTCGAGCAGAGTT
RPC3g	TAGAGCACAGCCTGTCCGTG$(CTAACC)_3$GG
RP	TAGAGCACAGCCTGTCCGTG

เตรียม TRAP reaction buffer ปริมาตร 48 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl ,pH8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 63 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.1 mg/ml BSA, 0.005% tween 20, 50 µM dNTPs, 5 µCi (α-^{32}P)-dGTP (3000 ci/mmol), 25 pmol MTS

primer และ เทโลเมอเรสที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 1 หรือใน mixture นี้จะมีสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส เช่นอาจใช้ความเข้มข้น ที่ 0, 4, 8, และ 16 ไมโครโมลาร์ เป็นต้น นำสารละลายปฏิกิริยาดังกล่าวบ่มใน Thermocycler ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อที่จะให้เทโลเมอเรสต่อความยาวของ MTS ซึ่งเป็นสับสเตรตของเทโลเมอเรส หลังจากนั้นทำลายสภาพธรรมชาติของเทโลเมอเรสโดยการต้มที่ 90 °C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อไม่ให้เอนไซม์เทโลเมอเรสทำงานได้อีก แล้วจึงดำเนินการในขั้นตอนที่ 3

การเพิ่มปริมาณ Telomerase product โดยวิธีพีซีอาร์

ในการทดลองขั้นนี้ เป็นการเพิ่มปริมาณ telomerase product โดยใช้วิธีพีซีอาร์ โดยเติม 2 ไมโครลิตรของ reverse mixture ซึ่งประกอบด้วย 3 units ของ Taq DNA polymerase 25 pmol ของ RP primer และ 0.5 pmol ของ RPc3g โดยเป็นการทำ hot-start PCR หลังจากนั้นนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Thermocycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการตั้งโปรแกรมจำนวน 29 รอบของอุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

รอบที่ 1-2: ใช้อุณหภูมิที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 55 °C เป็นเวลา 60 วินาที

รอบที่ 3-29: ใช้อุณหภูมิที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที 63 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) และ PhosphorImaging

เติม 5 ไมโครลิตรของ 10X loading dye ซึ่งประกอบด้วย 0.25% ของ bromphenol blue และ xylene cyanol ใน 50% glycerol/50 mM EDTA ลงในแต่ละหลอดของ PCR product หยอดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรลงในหลุมของ 16% non-denaturing polyacrylamide gel ใน 1X TBE buffer วิ่งสารตัวอย่างภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 500 โวลต์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีของ bromphenol blue ห่างจากหลุมประมาณ 12-15 เซนติเมตร นำเจลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์สัญญาณของสารรังสีด้วย PhosphorImager™ .

การทดลองที่ 3: การผลิตเทโลเมอเรสโดยการแสดงออกระยะสั้น ของยีนเทโล-เมอเรสที่อยู่ในพลาสมิดเพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเทโลเมอเรสโดยตรง

TRAP assay เป็นวิธีที่เพิ่มความไว (Sensitivity) ให้กับการวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์เทโลเมอเรส แต่เนื่องจากสารตัวอย่างที่เราทดสอบ สามารถยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ทำให้ได้ผลบวกลวงได้ วิธีที่ดีที่สุด คือการขจัดขั้นตอน PCR นี้ โดยการใช้เอนไซม์เทโลเมอเรสที่มากขึ้น ที่พอเพียงที่จะทำให้เห็นผลของ Primer extension ได้โดยตรง เราจึงได้ทำการทดลองผลิตเทโลเมอเรสโดยการสอดใส่พลาสมิดสองชนิดที่จำเป็นต่อการสร้างเทโลเมอเรส (pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR) ลงในเซลล์ HEK293T เพื่อให้เซลล์นี้ ทำหน้าที่ผลิตเทโลเมอเรส ซึ่งสามารถทำให้เพิ่มปริมาณเทโลเมอเรสได้ไม่ต่ำกว่าสองร้อยเท่า ขั้นตอนการทดลองแสดงในรูปที่ 5

การเพิ่มปริมาณ pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR ในเซลล์ *E.coli*

⬇

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเซลล์ *E.coli*

⬇

การตรวจสอบขนาดและความถูกต้องของยีนที่อยู่ในพลาสมิดโดยวิธีพีซีอาร์

⬇

การทรานสเฟคชั่นของพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293T

⬇

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน hTERT และยีน hTR ภายหลังการทรานสเฟคชั่น โดยวิธี Reverse Transcriptase-PCR และ Western blotting analysis

รูปที่ 2.2: ขั้นตอนการผลิตเทโลเมอเรสโดยการแสดงออกระยะสั้น

ข้อมูลพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนของ hTERT และพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนของ hTR

การผลิตเอนไซม์เทโลเมอเรสจำนวนมาก โดยการใช้การแสดงออกระยะสั้น (Transient expression) ของยีนเทโลเมอเรสที่อยู่ในพลาสมิด จำเป็นต้องใช้พลาสมิดดีเอ็นเอสองชนิดคือ pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR โดย pVan107-hTERT เป็นพลาสมิดที่มียีนของ hTERT หรือ catalytic subunit (phTERT) ของเทโลเมอเรส และ pBS-U1-hTR เป็นพลาสมิดที่มียีนของ hTR หรือ RNA subunit ของเทโลเมอเรส ทั้งสอง subunit นี้จะรวมกันเป็นเอนไซม์เทโลเมอเรสซึ่งเป็นโฮโลเอนไซม์ที่ทำงานได้

พลาสมิด pVan107-hTERT มี hTERT cDNA ขนาด 4027 คู่เบส (รหัส gene bank : AF018167) โคลนลงในจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI ของพลาสมิด pcDNA 6/myc-his C (Invitrogen) ที่มีขนาด 5126 คู่เบส โดยที่รหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีนจะอยู่ก่อน (upstream) รหัสของ tag protein เพื่อให้มีการแสดงออกของ hTERT protein ที่ไม่ถูกเชื่อมต่อด้วย tag protein เมื่อโคลนยีนดังกล่าวลงใน pcDNA6/myc-his C จะได้พลาสมิดที่มีขนาด 9153 bp พลาสมิด pBS-U1-hTR มีส่วน hTR cDNA ขนาด 451 bp (รหัส gene bank: BC128029) โคลนลงในจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI และ HindIII ของ พลาสมิด pBlueScript II SK(+) (Stratagene, 2961 bp) ใต้ U1 promoter เมื่อโคลนยีนลงใน pBlueScript II SK(+) จะได้พลาสมิดที่มีขนาด 3412 bp พลาสมิดทั้งสองชนิด มียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิดแอมพิซิลิน เพื่อให้สะดวกในการตรวจสอบหา transformant โดยการคัดเลือกจากโคลนที่ต้านยาแอมพิซิลิน

การเพิ่มปริมาณ pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR ในเซลล์ *E.coli*

เราได้ทำการการเพิ่มปริมาณ pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR ในเซลล์ *E.coli* โดยการทรานสฟอร์มพลาสมิดแต่ละตัวลงในเซลล์ *E.coli* โดยวิธี Heat shock โดยเริ่มจากการนำเอา *E.coli* สายพันธุ์ DH5α (ใน 25 % glycerol) จากที่เก็บไว้ที่ -80 °C ปล่อยให้ละลายและดูด 50 ไมโครลิตรของเซลล์ *E.coli* ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วแช่ไว้ในน้ำแข็ง หลังจากนั้นเติมสารละลายพลาสมิดที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ ลงในหลอดทดลองที่มีเซลล์ *E.coli* แช่ส่วนผสมนี้ไว้ในน้ำแข็งระยะเวลาหนึ่ง แล้วจึงจุ่มหลอดทดลองลงในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วนำกลับเอาหลอดทดลอง มาจุ่มในน้ำแข็งอีก เป็นเวลา 2 นาที เติม 1 ml ของ LB medium ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ *E.Coli* ไปเลี้ยงใน LB agar plate ที่มี 100 µg/ml แอมพิซิลลิน ที่ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อคัดเลือก *E.coli* ที่มีพลาสมิดในเซลล์ ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นโคโลนีได้เนื่องจากมียีนต้านแอมพิซิลลิน เลือก *E.coli* ที่มีพลาสมิดเพียงหนึ่งโคโลนี มาเพาะเลี้ยงใน 2 ml ของอาหารเหลว LB (ที่มี100 µg/ml แอมพิซิลลิน) โดยบ่มในตู้เพาะเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อในขั้นแรก หลังจากนั้นเจือจางส่วนผสมนี้ด้วยอาหารเหลว LB (ที่มี 100 µg/ml แอมพิซิลิน) ปริมาณ 500 เท่า (0.5 ml ของ starter ใน 250 ml ของอาหารเหลว LB) แล้วบ่มในตู้เพาะเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 37 °C โดยทำการเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.6-0.8 หลังจากนั้นจึงปั่นเซลล์ *E.coli* ที่ 6,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

พลาสมิดที่เพิ่มจำนวนในเซลล์ของ *E.coli* ถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAGEN plasmid purification kit โดยใช้ขั้นตอนการสกัดตามผู้ผลิตโดยย่อดังนี้ ละลายตะกอนของเซลล์ *E.coli* ด้วยสายละลายที่มี 200 mM NaOH และ 1 % SDS ซึ่งจะทำให้เซลล์ของ *E.Coli* แตกตามหลักการของ alkaline lysis จากนั้นนำสารละลายเซลล์ *E.Coli* ที่กรองเอาตะกอนเซลล์ออก เติมลงใน anion exchange column ภายใต้ความเข้มข้นของเกลือต่ำและ pH ที่เหมาะสม แยกเอาอาร์เอ็นเอและโปรตีนออกจากพลาสมิด โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของเกลือปานกลางชะออก ส่วนพลาสมิดดีเอ็นจะจะถูกชะออกโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ตกตะกอนพลาสมิดโดยการใช้ isopropanol วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์โดยวัดค่า Absorbance ที่ 260 nm และ 260/280 nm ตามลำดับโดยใช้ UV spectrometer

การตรวจสอบขนาดพลาสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโทรฟอรีซิส

นำพลาสมิด pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR ที่แยกบริสุทธิ์แล้วมาเจือจางให้มีดีเอ็นเอประมาณ 1 ไมโครโมลาร์ มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ HindIII ที่มีจุดตัดเพียงตำแหน่งเดียวบนพลาสมิด หลังจากตัดจะได้ single band ของพลาสมิดที่เป็นเส้นตรง แล้วผลมกับ 5X loading dye ที่มี 0.25% bromphenol blue 0.25% xylene cyanol และ 30 % glycerol ในบัฟเฟอร์ 5X TBE ก่อนที่ละหยอดลงในหลุมของ 0.8 % agarose gel วิ่งตัวอย่างพลาสมิดที่ตัดด้วย HindIII กับที่ไม่ได้ตัดด้วย HindIII เทียบกันกับ 1 kbp Ladder marker ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที หรือจนกระทั่งสีของ bromphenol blue วิ่งได้ระยะ 3 ส่วน 4 ของเจล หลังจาก Electrophoresis ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide โดยเจือจาง stock 10 mg/ml Ethidium bromide 1:10,000 ในน้ำกลั่น ย้อมเป็นเวลา 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Doc

การตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่อยู่ในพลาสมิดโดยวิธีพีซีอาร์

เพื่อตรวจสอบว่าพลาสมิด pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR ที่แยกบริสุทธิ์มียีนที่ต้องการ เราจึงนำพลาสมิด pVan107-hTERT และพลาสมิด pBS-U1-hTR ที่แยกบริสุทธิ์แล้ว มาเจือจาง เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน hTERT และ ต่อยีน hTR ตามลำดับ

ตารางที่ 2.3: ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่อยู่ในพลาสมิด

ชื่อ	ลำดับเบส	ขนาด PCR product
hTERT (F)	GCCTGAGCTGTACTTTGTCAA	457
hTERT (R)	CGCAAACAGCTTGTTCTCCATGTC	
hTR (F)	GAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGC	111
hTR (R)	GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAGG	

ใน 10 ไมโครลิตรของ PCR reaction mixture ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.5 µM Forward primer, 0.5 µM Reverse primer และ 2 unit ของ Taq DNA polymerase นำตัวอย่างเข้าเครื่อง Thermocycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เริ่มต้นด้วยการ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการโปรแกรมจำนวน 30 รอบ ของอุณหภูมิและเวลา ดังต่อไปนี้ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 61 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Polymerization ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที เสร็จแล้วจึงต่อด้วยอุณหภูมิ 72 °C อีก 4 นาที นำPCR product ที่ได้ผสมกับ 5X loading dye ที่มี 0.25% bromphenol blue 0.25% xylene cyanol และ 30 % glycerol ในบัฟเฟอร์ 5X TBE ก่อนที่ละหยอดลงในหลุมของ 2.0 % agarose gel วิ่งตัวอย่างควบคู่กับ 100 bp Ladder marker ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที หรือจนกระทั่งสีของ bromphenol blue วิ่งได้ระยะ 3 ส่วน 4 ของเจล หลังจาก Electrophoresis ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide โดยเจือจาง stock 10 mg/ml Ethidium bromide 1: 10,000 ในน้ำกลั่น ย้อมเป็นเวลา 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Doc

การทรานสเฟคชั่นของพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293T

หนึ่งวันก่อนทำการทรานสเฟคชั่น เลี้ยงเซลล์ HEK293T จำนวน $5x10^5$ เซลล์ ในแต่ละหลุมของ 6-well plate โดยใช้อาหาร DMEM ที่มี 10% FBS และ Antibiotic

<u>การทรานสเฟคชั่นโดย Lipofectamine 2000 ™ (Invitrogen)</u>

ตรวจดูความหนาแน่นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 80-90% confluent แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วเปลี่ยนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ไม่มี Antibiotic แล้วบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลาอย่างน้อยสองชั่วโมง ละลาย 4 µg ของพลาสมิด pVan107-hTERT และ/หรือ pBS-U1-hTR ด้วย 250 µl ของ Opti-MEM serum-

free medium (Invitrogen) และ ละลาย 2-8 µl ของ Lipofectamine 2000 ด้วย 250 µl ของ Opti-MEM serum-free medium ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะนำทั้งสองสารละลายที่เตรียมได้ดังกล่าว ผสมโดยการใช้ Vortex mixer แล้วปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 25 นาที เพื่อที่จะให้เกิดเป็นสารประกอบของ DNA-Lipofectamine 2000 หลังจากนั้นดูดสารประกอบของ DNA-Lipofectamine 2000 ใส่ลงใน medium ของเซลล์ HEK293T โดยตรง แล้วหมุนจานเลี้ยงเบาๆเพื่อให้ DNA-Lipofectamine 2000 complex กระจายสู่เซลล์อย่างทั่วถึง นำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง ก่อนที่จะดูดเอา medium ที่มี Lipofectamine 2000 reagent ออกแล้วเปลี่ยนด้วย Growth medium ใหม่แล้วจึงนำกลับไปเลี้ยงอีกครั้งในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง

<u>การทรานสเฟคชั่นโดยแคลเซียมฟอสเฟต</u>

จะต้องตรวจดูความหนาแน่นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 60-70% confluent แล้วดูด medium เก่าออกแล้วเปลี่ยนด้วย medium ใหม่ที่ไม่มี serum แล้วบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C 5 % CO_2 เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนการทรานสเฟคชั่น ผสม 4 µg พลาสมิด pVan107-hTERT และ/หรือ pBS-U1-hTR ด้วย 25 µl ของ 2.5 M $CaCl_2$ แล้วปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ได้ปริมาตร 125 µl จากนั้นนำมาผสมกับสารละลาย 2X HBS ทีละหยดในขณะที่มีการทำให้เกิดฟองอากาศในสารละลาย ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 25 นาที เพื่อที่จะให้เกิดเป็นตะกอนของ DNA-$CaPO_4$ หลังจากนั้นดูดตะกอนของ DNA-$CaPO_4$ ใส่ลงใน medium ของเซลล์ HEK293T โดยตรง แล้วหมุนจานเลี้ยงเบาๆเพื่อให้ ตะกอนของ DNA-$CaPO_4$ กระจายทั่วถึง และเข้าสู่เซลล์โดยเอนโดไซโตซิส นำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมง ก่อนที่จะดูดเอา medium ที่มี DNA-$CaPO_4$ ออกแล้วเปลี่ยนด้วย growth medium ใหม่แล้วจึงนำกลับไปเลี้ยงอีกครั้งในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง การทดลองหลังจากนั้นจะเป็นการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่อยู่ในพลาสมิดโดยใช้ Reverse transcriptase–PCR และ Western blotting analysis

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน hTERT และยีน hTR ในระดับ mRNA ภายหลังการทรานสเฟคชั่น โดยวิธี Reverse Transcriptase-PCR

นำเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟคด้วยพลาสมิด pVan107-hTERT และ/หรือ pBS-U1-hTR มาสกัดเอา RNA โดยใช้ Trizol® reagent (Invitrogen) ตามขั้นตอนของผู้ผลิต โดยจะกล่าวโดยย่อดังต่อไปนี้ ใช้ 1 ml ของ Trizol® ละลายเซลล์ที่อยู่ในหลุมของจานเลี้ยง ย้ายสารละลายใส่หลอดทดลองใหม่ แล้วเติม Chloroform 0.2 ml หลังจากนั้นจึงแยก Aqueous phase ที่มี RNA อยู่มาตกตะกอนด้วย Isopropanol ซึ่งจะได้ตะกอนของ RNA นำไปผึ่งแห้งแล้วละลายกลับด้วย DEPC-treated water และนำไปวัดหาความเข้มข้นเพื่อที่จะใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

ทำ Reaction mixture ของ Reverse transcription ปริมาตร 20 µl ที่มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ 1 µg ของ RNA 0.5 µg ของ oligo-dT 1 mM dNTPs 20 unit ของ Ribonuclease inhibitor และ 200 units ของ Reverse transcriptase โดยใช้ DEPC-treated water ปรับปริมาตร นำ Reaction mixture บ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ cDNA ที่ได้มาจาก RNA หลังจากนั้นเป็นการเพิ่มปริมาณของ cDNA ที่ต้องการโดยใช้ไพร-เมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน hTERT และ ต่อยีน hTR โดยมี GAPDH เป็นยีนควบคุมปริมาณ cDNA ที่ใช้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนี้จะเทียบกันกับ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกทรานสเฟค และเทียบกับยีน GAPDH โดยใน 10 µl ของ PCR-reaction ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.5 µM Forward primer, 0.5 µM Reverse primer, 2 units ของ Taq DNA polymerase และ 1 µl ของ cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้น เริ่มการเพิ่มปริมาณดี-เอ็นเอด้วยการ Denaturation ที่ 94 oC เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยการทำงานจำนวน 30 รอบ ของอุณหภูมิและเวลา ดังต่อไปนี้ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 61 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Polymerization ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที เสร็จแล้วจึงต่อด้วยอุณหภูมิ 72 °C อีก 4 นาที นำ PCR product ที่ได้ผสมกับ 5X Loading dye ที่มี 0.25% Bromphenol blue และ 30 % glycerol ในบัฟเฟอร์ 5X TBE ก่อนที่ละหยอดลงในหลุมของ 2.0 % agarose gel วิ่งตัวอย่างควบคู่กับ 100 bp Ladder marker ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้น ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide โดยเจือจาง stock 10 mg/ml Ethidium bromide 1:10,000 ในน้ำกลั่น

ย้อมเป็นเวลา 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Doc

ตารางที่ 2.4: ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนภายหลังการทรานสเฟ็คชั่น โดยวิธี RT-PCR

ชื่อ	ลำดับเบส	ขนาด PCR product
hTERT (F)	GCCTGAGCTGTACTTTGTCAA	457 (Full length)
hTERT (R)	CGCAAACAGCTTGTTCTCCATGTC	275 (β-splicing)
hTR (F)	GAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGC	111
hTR (R)	GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAGG	
GAPDH (F)	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
GAPDH (R)	TCCACCACCCTGTGCTGTA	

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน hTERT ที่ระดับโปรตีน ภายหลังการทรานสเฟคชั่น โดยวิธี Western blotting analysis

นำเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟคด้วยพลาสมิด pVan107-hTERT และ/หรือ pBS-U1-hTR มาทำให้หลุดจากจานเลี้ยงด้วย 1x Trypsin-EDTA และปั่นล้างด้วย PBS 2 รอบ แล้วจึงนำมาสกัดโปรตีนโดยใช้ 1X CHAPS lysis buffer ที่ประกอบไปด้วย 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA, 5 mM ß-Mercaptoethanol, 0.5 % CHAPS, 10% Glycerol, และ Protease inhibitor cocktail (Roche) ผสมเซลล์ให้เข้ากับ Lysis buffer ให้ดีด้วย Vortex mixer หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะปั่นตกเศษเซลล์ให้ตกที่ 12000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสลงในหลิดทดลองที่ทำให้เย็นแล้วที่ต่ำกว่า 0 °C นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวัดหาค่าความเข้มเข้นของโปรตีนโดยใช้ Bradford reagent และนำสารละลายส่วนใสที่ได้นี้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อรอใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

นำโปรตีนในปริมาณเท่ากันของแต่ละตัวอย่างผสมกับ Protein loading dye นำไปต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะนำไปแยกใน 8% SDS-PAGE เทียบกับ Molecular weight marker (BIORAD) แล้วทำการย้ายโปรตีนโดยกระแสไฟฟ้าไปยัง PVDF membrane ทำการ Block แผ่น Membrane ด้วย 10% BSA หลังจากนั้นเติม Anti-telomerase mouse monoclonal antibody (AB5181, Abcam) ที่ความเข้มข้น 1:1,000

ใน 1% BSA เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างออก แล้วเติม Secondary antibody-conjugated horse radish peroxidase ในอัตราส่วน 1:10,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำ membrane ทำปฏิกิริยากับ SuperSignal® Enhance Chemiluminescence (PIERCE) ประกบกับ X-ray film (Kodak) เพื่อหาแถบของโปรตีนเทโลเมอเรส นอกจากนี้มีการใช้ Primary antibody อีกตัวคือ Anti-telomerase rabbit polyclonal antibody (AB63370, Abcam) โดยใช้ 1:1,000 ใน 1 % BSA เพื่อเทียบกันกับ Mouse monoclonal antibody

การทดลองที่ 4: การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดตัวอย่างต่อเซลล์มะเร็งปอด โดยวิธี Sulforhodamine B assay

วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยอาศัยหลักการที่ว่า SRB สามารถย้อมสีโปรตีนของเซลล์ซึ่งถูกตรึงเข้ากับผนังของจานเลี้ยงเซลล์โดย Trichloroacetic acid โดยโมเลกุลของ SRB มีกลุ่ม Sulfonate ที่มีประจุลบสองกลุ่ม สามารถจับได้กับกรดอะมิโนที่มีประจุบวก ในสภาวะกรดอ่อน และ การจับกันระหว่างกันนี้ สามารถแยกออกได้ ในสภาวะที่เป็นด่าง โดยปริมาณของสี SRB ที่สกัดออกจากการย้อมโปรตีนนี้ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์นั้นๆ [60]

การเตรียมสารสกัดตัวอย่างใน 96-well plate

ทำการเตรียมสารสกัดตัวอย่างใน 96-well plate โดยละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2560 µg/µl แล้วทำ two-fold serial dilution จาก 2560 µg/µl จนถึง 40 µg/µl โดยให้ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยหลุมสุดท้ายของคอลัมน์ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 เป็น negative control ทำสามหลุมที่เหมือนกัน (triplicate) ผสมสารตัวอย่างด้วยปิเปตหลายๆครั้งก่อนที่จะดูดแต่ละครั้ง

การเตรียมเซลล์มะเร็งปอด A549

เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium 1640 ที่มี fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้น 10% และมี pH 7.2 - 7.4 โดยทำเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์มะเร็งปอดให้ได้ปริมาณ 80% confluence จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย sterile PBS แล้วใช้ 0.25 % (wt/vol) trypsin ให้เซลล์หลุด เมื่อเซลล์เริ่มหลุดให้ใช้ sterized pipettes ชะเซลล์ออกโดยใช้ complete medium ที่มี FBS หลังจากนั้นจึงดูดเป่าโดยใช้ปิเปตให้ได้ homologous cell suspension ปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว

รอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการนับเซลล์ด้วย hemocytometer โดยคำนวณจากสูตรดังนี้คือ

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อไมโครลิตร) = N x Cv x Cd

โดยที่ N คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้

Cv คือ ค่า correction factor ของปริมาตร

Cd คือ ค่า correction factor ของ dilution

SRB Assay

ปรับความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ด้วย growth medium เพื่อให้ได้ seeding density ที่ 10,000 เซลล์ต่อหลุม ผสมสารละลายเซลล์ที่เตรียม ปริมาตร 190 µl (10,000 เซลล์) ลงใน 96-well plate ที่มีสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆตามที่เตรียมไว้ โดยในระหว่างที่ใส่เซลล์ให้ใช้ multi-channel pipette ดูดเป่าสารละลายเซลล์เป็นครั้งคราวเพื่อให้เซลล์กระจายตัวสม่ำเสมอ จากนั้นนำ 96-well plate ไปเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C โดย plate ที่ 1 บ่มเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ตกเกาะก้นหลุมอย่างสมบูรณ์และให้ plate ที่ 1 เป็น no-growth control (วันที่ 0) ส่วน plate ที่ 2 บ่มใน incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

หลังจากครบเวลาแล้ว ค่อยๆเติม 10 % trichloroacetic acid 100 µl ลงในแต่ละหลุมโดยไม่มีการเอา culture medium ออกแล้วนำไปแช่ที่ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง แล้วคว่ำ plate ลงบนกระดาษทิชชู่ เพื่อซับน้ำออก ปล่อยให้แห้งด้วยอากาศภายในห้อง (20-25 °C) ในขั้นตอนนี้ หลังจากที่ปล่อยให้เซลล์แห้งสามารถเก็บ plate ได้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย 0.057% sulforhodamine B 100 µl ในแต่ละหลุม ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีแล้วล้างด้วย 1% (vol/vol) acetic acid อย่างรวดเร็ว 4 รอบ แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเซลล์จะถูกทำให้ติดกับ plate ด้วย 10 % trichloroacetic acid และย้อมด้วย sulforhodamine B เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้าง sulforhodamine B ส่วนเกินออกด้วย 1% acetic acid หลังจากนั้น สีที่ติดอยู่กับโปรตีนจะถูกละลายออกมาด้วยสารละลาย 10 mM Tris base จึงนำมาวัดค่า OD ที่ 510 nm โดยใช้ microplate reader

การวัดค่าการดูดกลืนแสงและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

เติม 10 mM Tris base solution (pH 10.5) 200 µl ลงไปในแต่ละหลุม เขย่า plate ด้วย gyratory shaker เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อละลายสี sulforodamine B ที่ติดกับ

โปรตีน จากนั้นวัดค่า absorbance ที่ 510 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader คำนวนเปอร์เซนต์ของ cell growth inhibition โดยใช้สูตร

$$\% \text{ of control cell growth} = \frac{\text{mean OD}_{\text{sample}} - \text{mean OD}_{\text{day 0}}}{\text{mean OD}_{\text{neg control}} - \text{mean OD}_{\text{day 0}}} \times 100$$

$$\% \text{ growth inhibition} = 100 - \% \text{ of control cell growth}$$

กราฟพล๊อตระหว่าง ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง กับ % growth inhibition สามารถนำไปหาค่า 50 % ของ Inhibition concentration (IC_{50}) และนอกจากนี้สามารถใช้ซอฟแวร์curve-fitting methods ในการหาค่า IC_{50}

ในแต่ละชนิดของสารสกัด เราได้ทำการทดลอง SRB Assay สามครั้ง ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน (Three time independent study) โดยเริ่มจากการเลี้ยงเซลล์ชุดใหม่ ในแต่ละชุดของเซลล์ ค่าที่ได้ในแต่ละความเข้มข้น เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองในสามหลุม นำค่าเฉลี่ยจากสามการทดลอง มาหาค่า mean ± SD แล้วนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95% หรือ $P<0.05$

การทดลองที่ 5: การศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR

วิธี RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) มีหลักการอย่างคร่าวๆ คือ เมื่อยีนใดภายในเซลล์มีการแสดงออก ก็จะมีกระบวนการทรานสคริปชั่นให้ได้ mRNA เราสามารถเปลียน mRNA ที่ได้จากการแสดงออกของทุกยีนภายในเซลล์นั้นๆให้เป็น cDNA โดยเอนไซม์ Reverse transcriptase และเลือกทำการเพิ่มปริมาณของ cDNA จากยีนที่เราสนใจ โดยการใช้ไพรเมอร์เฉพาะต่อยีนนั้นๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ถ้าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอที่สนใจ (ภายหลังการแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดย Agarose gel electrophoresis) ก็แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนนั้นๆ ถ้าหากมีสารใดก็ตาม ที่ส่งผลยับยั้งการทำงานเฉพาะยีนที่เราสนใจ ก็จะทำให้มีการแสดงออกของยีนนั้นๆ ลดลงในระดับ mRNA ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณ cDNA ที่ลดลง ทำให้เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR แล้ว จะได้ปริมาณดีเอ็นเอจากยีนที่เราสนใจลดน้อยลงไปด้วย (แต่ต้องมีการควบคุมปริมาณรอบของ PCR cycle ให้อยู่ในระดับที่สามารถให้ผลที่เห็นความแตกต่างเมื่อมีปริมาณ cDNA ที่แตกต่างกัน)

ในการทดลองนี้ เราต้องการที่จะตรวจสอบหาสารที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้างเทโลเมอเรส โดยเฉพาะยีน hTERT ซึ่งสร้าง Catalytic subunit ของเทโลเมอเรส ดังนั้น เราจะนำสารสกัดที่ได้ ในปริมาณที่เป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ ที่ปริมาณต่างๆ เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์มะเร็งปอด A549 หลังจากนั้น ทำการวิเคราะห์โดยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์เฉพาะต่อยีน hTERT เทียบกับการแสดงออกของยีน GAPDH ซึ่งเป็น House keeping gene (ยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในสภาวะปกติของเซลล์ เนื่องจากมีความจำเป็นในการดำรงชีวิตตามปกติ) ซึ่งเราใช้เป็น Internal control

นอกจากยีน hTERT แล้ว เรายังทำการศึกษาผลของสารสกัดต่อยีน c-Myc, ยีน Mad, และ ยีน Max ยีนสามชนิดนี้ สร้าง Transcription factor ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีน hTERT โดย c-Myc จะรวมตัวกับ Max แล้วไปจับที่ E-box บนโปรโมเตอร์ของ hTERT ทำให้มีการแสดงออกของยีน hTERT มากขึ้น ในขณะที่ การเพิ่มการแสดงออกของ Mad ซึ่งจะไปจับกับ Max แล้วไปจับที่ E-box เช่นกัน กลับทำให้มีการแสดงออกของยีน hTERT น้อยลง [22]

ผังขั้นตอนการทดลองการศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR มีดังต่อไปนี้

เลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด A549 ร่วมกับสารสกัด

⬇

สกัด RNA จากเซลล์

⬇

เปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA โดย Reverse transcription

⬇

เพิ่มปริมาณของ cDNA ที่สนใจ โดยวิธี PCR

⬇

แยกดีเอ็นเอตามขนาดโดย Agarose gel electrophoresis

⬇

วิเคราะห์ผล

การเตรียมเซลล์มะเร็งปอด A549

เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium 1640 ที่มี fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้น 10% และมี pH 7.2-7.4 โดยทำเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์มะเร็งปอดให้ได้ปริมาณ 80% confluence จากนั้นทำการ

ล้างเซลล์ด้วย sterile PBS แล้วใช้ 0.25 % (wt/vol) trypsin ให้เซลล์หลุด เมื่อเซลล์เริ่มหลุดให้ใช้ sterized pipettes ชะเซลล์ออกโดยใช้ complete medium ที่มี FBS หลังจากนั้นจึงดูดเป่าโดยใช้ปิเปตให้ได้ homologous cell suspension ปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการนับเซลล์ด้วย hemocytometer โดยคำนวณจากสูตรดังนี้คือ

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อไมโครลิตร) = N x Cv x Cd

โดยที่ N คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้

Cv คือ ค่า correction factor ของปริมาตร

Cd คือ ค่า correction factor ของ dilution

การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด A549 ร่วมกับสารสกัด

นำเซลล์มะเร็งปอด A549 มาเลี้ยงใน 6-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี 10% Fetal calf serum โดยมีปริมาตรหลุมละ 2 ml ในแต่ละหลุมของ plate จะมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 3 x 10^5 cells/ml ในการทดลองให้หลุมที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม คือไม่เติมสารสกัด และหลุมที่ 2-6 เป็นกลุ่มทดสอบ ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การสกัด RNA จากเซลล์

ทำการเติม TRIZOL ลงในจานเลี้ยงเซลล์ (1 ml ต่อจานขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 ซม.) และใช้ scraper ขูดชั้น monolayer ของเซลล์ หลังจากนั้นเติม 0.2 ml chloroform ต่อ 1 ml TRIZOL และทำการเขย่าอย่างแรงด้วยมือประมาณ 15 ครั้ง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ที่อุณหภูมิ 15-30 ^{0}C และจากนั้นใช้ปั่นแยกที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จ จะสามารถแยกชั้นออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนใสบนสุด เป็นชั้นของ RNA (upper phase) และส่วนกลางเป็นชั้นของ protein, membrane(inter phase) และชั้นสุดท้ายอยู่ล่างสุดเป็น DNA (lower phase) ทำการดูดเอาส่วนของ RNA ใส่ในหลอดทดลองใหม่ แล้วนำไปการตกตะกอนด้วย isopropyl alcohol (0.5 ml ต่อ TRIZOL 1 ml) และทำการเขย่า 2-3 ที และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ปั่นแยกที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C จะเห็น RNA ตกตะกอนที่ก้นหลอดทดลอง เทส่วนของ supernatant ทิ้ง และทำการล้าง RNA pellet 1 ครั้งด้วย 75% ethanol ปั่นแยกอีกครั้ง เทส่วนของ supernatant ทิ้ง และปล่อยให้ RNA pellet โดย air-dry เป็นเวลา 5-10 นาที (RNA pellet ต้องแห้ง) และทำการเจือจาง RNA pellet ด้วย DEPC-treated water

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

50 µl วัดความเข้มข้นจากการดูดกลืนที่คลื่นแสง 260 nm และประเมินความบริสุทธิ์ โดยอาร์เอ็นเอที่ได้ ควรมีอัตราค่าการดูดกลืนที่คลื่นแสง 260 nm ต่อ 280 nm (OD_{260}: OD_{280}) อยู่ระหว่าง 1.6-2.0

การเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA โดย Reverse transcription

เตรียม Reaction mixture ของ Reverse transcription ปริมาตร 20 µl ที่มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ 1 µg ของ RNA 0.5 µg ของ oligo-dT 1 mM dNTPs 20 unit ของ Ribonuclease inhibitor และ 200 units ของ Reverse transcriptase โดยใช้ DEPC-treated water ปรับปริมาตร นำ Reaction mixture บ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ cDNA ที่ได้มาจาก RNA

การเพิ่มปริมาณของ cDNA ที่สนใจ โดยวิธี PCR

เตรียม 10 µl ของ PCR-reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.5 µM Forward primer, 0.5 µM Reverse primer, 2 units ของ Taq DNA polymerase และ 1 µl ของ cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้น เริ่มด้วยการ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยการทำงานจำนวน 30 รอบ ของอุณหภูมิและเวลา ดังต่อไปนี้ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Polymerization ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที เสร็จแล้วจึงต่อด้วยอุณหภูมิ 72 °C อีก 4 นาที และเก็บหลอดทดลองที่ 4 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis

การแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดย Agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ที่ได้ผสมกับ 5X Loading dye ที่มี 0.25% Bromphenol blue และ 30 % glycerol ในบัฟเฟอร์ 5X TBE ก่อนที่ละหยอดลงในหลุมของ 2.0 % agarose gel วิ่งตัวอย่างควบคู่กับ 100 bp Ladder marker ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที หรือจนกระทั่งสีของ Bromphenol blue วิ่งได้ระยะ 3 ส่วน 4 ของเจล หลังจาก Electrophoresis ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide โดยเจือจาง stock 10 mg/ml Ethidium bromide 1:10,000 ในน้ำกลั่น ย้อมเป็นเวลา 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Doc

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. การประเมินความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *hTERT*, *C-myc*, *VEGF*, *Mad* และ *Max* นั้นเราสามารถประเมินโดยดูปริมาณของยีน *hTERT*, *C-myc*, *VEGF*, *Mad* และ *Max* เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการศึกษาด้วย RT-PCR ซึ่งการเปรียบเทียบความสามารถนั้นจะใช้ค่า arbitrary unit ที่สามารถวัดได้ด้วยเครื่อง densitometer

2. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อบงบอกความแตกต่างของข้อมูล จากการศึกษาผลการทดลอง ที่ทำการทดลองทั้งหมด 3-4 ครั้ง ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน (Three time independent study) โดยนำค่า mean ± SD ที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมัน 95% หรือ $P<0.05$

ตารางที่ 2.5: ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน *hTERT* ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR

ชื่อ	ลำดับเบส	ขนาด PCR product
hTERT (F)	GCCTGAGCTGTACTTTGTCAA	457
hTERT (R)	CGCAAACAGCTTGTTCTCCATGTC	275 (β-splicing)
GAPDH (F)	CCACAGTCCATGCCATCAC	452
GAPDH (R)	CCACCACCCTGTTGCTGTA	
c-Myc (F)	TAATTCCAGCGAGAGGCAGA	290
c-MYc (R)	GTCCCCAAATGGGCAGAATA	
Mad (F)	GAGATGCCTTAAAACGGAGG	592
Mad (R)	AACCAACAGGGAGAACCTTC	
Max (F)	TCAATCTGCGGCTGACAAAC	421
Max (R)	TGGTGTAGAGGCTGTTGTCT	

การทดลองที่ 6: การศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าขิงต่อการแสดงออกของโปรตีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี Western blot

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน hTERT โดย Western blot analysis เพื่อต้องการศึกษาว่าสารสกัดจากเหง้าของขิงในชั้น acetone ซึ่งเป็นส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงของของยีน hTERT ว่ามีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 ด้วยหรือไม่ โดยใช้สารสกัดจากเหง้าของขิง 3 ความเข้มข้น ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชม.และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างเดียว เพื่อทดสอบดูว่ามีการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน hTERT แบบ dose-dependent หรือไม่หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์และสกัดโปรตีนโดยใช้ CHAPS lysis buffer นำโปรตีนที่ได้มาแยกโดยใช้ SDS-PAGE และเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose หลังจากนั้นแผ่น nitrocellulose จะถูก block nonspecific binding site ด้วย 10% BSA (Bovine Serum Albumin) หลังจากนั้นเติม rabbit anti-hTERT ความเข้มข้น 1:1,000 ซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน hTERT แล้วจึงเติม goat anti-rabbit ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (PIERCE) ที่ความเข้มข้น 1:20,000 ทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal Enhance Chemiluminescence (PIERCE) แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X-ray ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้ เครื่อง scanning densitometry (Bio-Rad)

จากนั้นทำการวิเคราะห์ว่าสารสกัดจากเหง้าของขิงในชั้น acetone มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน hTERT แบบ time-dependent หรือไม่ การทดลองทำโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชม.

ในการทดลองนี้ได้ใช้โปรตีน Beta-actin ซึ่งเป็น house keeping gene เป็นโปรตีนควบคุมปริมาณ (internal control) เพื่อควบคุมปริมาณโปรตีนที่ทำการ load ว่ามีปริมาณที่เท่ากัน และตรวจสอบอีกครั้งโดยการย้อมเจลโดยการใช้สีย้อม Coomasie blue การย้อมโปรตีน Beta-actin ทำโดยใช้แผ่น nitrocellulose แผ่นเดิมที่ได้ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ hTERT ไปแล้ว มาทำการล้างเอาแอนติบอดีเก่าออก โดยแช่ในน้ำยา Restore Western Blot Stripping Buffer (PIRCE) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการล้างออกด้วย PBST ประมาณ 30 นาที (ล้าง 3 ครั้งๆละ 10 นาที) หลังจากนั้นทำการย้อมด้วย mouse anti-actin ความเข้มข้น 1:50,000 ซึ่งสามารถจับอย่างจำเพาะกับโปรตีน actin ทำการตรวจสอบผลโดยใช้ SuperSignal Enhance Chemiluminescence (PIERCE) แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X-ray ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปวัดความเข้มของแถบที่ได้โดยใช้ เครื่อง scanning densitometry (Bio-Rad)