

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

3.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ทำการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria* จากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย โดยได้รับการจำแนกและระบุชนิดจากคุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และเก็บตัวอย่างทองพันชั่ง (*R. nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกสกุล รวมทั้งเก็บตัวอย่างใบอังกาบจากต้นที่มาจากพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และนำมาปลูกจนได้พืชอายุประมาณ 2 ปี เพื่อใช้ใบในการสกัดสารต่อไป

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.1.2.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.1.2.3 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.1.2.4 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.1.2.5 *Micrococcus luteus* ATCC 9341

ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.3.1 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (murine lymphocytic leukemic cell line: P388)

3.1.3.2 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (human breast cancer cell line: MCF7)

3.1.3.3 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (human colon adenocarcinoma cell line: HT29)

3.1.3.4 เซลล์ไตลิงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line: Vero cell)

3.1.3.5 เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma cell line: HepG2)

3.1.3.6 เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (human mouth epidermal adenocarcinoma cell line: KB)

โดยลำดับที่ 1-4 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรทิพา ทิชา งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ลำดับที่ 5-6 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 3.1.4.1 ปีกเกอร์ (beaker)
- 3.1.4.2 กระบอกตวง (cylinder)
- 3.1.4.3 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- 3.1.4.4 ขวดแก้ว (bottle) ขนาดต่างๆ
- 3.1.4.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 3.1.4.6 แห้งแก้วงอ (spreader)
- 3.1.4.7 เข็มเย็บเย็บปลายแหลม (needle)
- 3.1.4.8 เข็มเย็บเย็บปลายแหลมงอ (hook)
- 3.1.4.9 ห่วงเย็บเย็บปลายกลม (loop)
- 3.1.4.10 ปากคีบ (forcept)
- 3.1.4.11 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 0.2, 1.5 และ 15 มิลลิลิตร
- 3.1.4.12 ลูกยาง (rubber bulb)
- 3.1.4.13 ช้อนตักสารเคมี (spatular)
- 3.1.4.14 คาร์ลิเปอร์ชนิดอัตโนมัติ (digital caliper)
- 3.1.4.15 ปีเปตต์ (pipette) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.4.16 ปีเปตแบบอัตโนมัติ (pipette boy)
- 3.1.4.17 ไมโครปีเปตต์ (micropipette)
- 3.1.4.18 ทิป (tip) ขนาดต่างๆ
- 3.1.4.19 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (flask) ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
- 3.1.4.20 ตะเกียง (burner)
- 3.1.4.21 สไลด์แก้ว (glass slide)
- 3.1.4.22 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)
- 3.1.4.23 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)
- 3.1.4.24 เครื่องนับ (counter)
- 3.1.4.25 ชุดอุปกรณ์การกรองพร้อมกระดาษกรองขนาด 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร
- 3.1.4.26 เครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator)
- 3.1.4.27 ไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ (microtiter plate reader) ฟิลเตอร์ (filter) สำหรับความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร
- 3.1.4.28 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 3.1.4.29 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- 3.1.4.30 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 3.1.4.31 ตู้เย็น (refrigerator) 4 และ -20 องศาเซลเซียส
- 3.1.4.32 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.1.4.33 กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง (Bright field microscope)
- 3.1.4.34 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted light microscope)
- 3.1.4.35 เครื่องชั่ง (balance)
- 3.1.4.36 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)

- 3.1.4.37 เครื่องช่วยผสม (vortex)
- 3.1.4.38 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 3.1.4.39 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.1.4.40 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)
- 3.1.4.41 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)
- 3.1.4.42 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transiluminator)
- 3.1.4.43 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 3.1.4.44 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle)
- 3.1.4.45 เครื่องระเหยสารแบบสุญญากาศชนิดหมุน (rotary evaporator); BUCHI
- 3.1.4.46 เครื่องไมโครเวฟ (microwave)
- 3.1.4.47 เวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier calipers)
- 3.1.4.48 โกร่งบดยาและที่บด (mortar and pestle)
- 3.1.4.49 แผ่น disc ขนาด 6 มิลลิเมตร (paper disc); whatman
- 3.1.4.50 ไม้พันสำลี (cotton stick)

3.1.5 วัสดุ และสารเคมี

- 3.1.5.1 ยาปฏิชีวนะ gentamicin
- 3.1.5.2 สาร mitomycinC
- 3.1.5.3 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton agar (MHA)
- 3.1.5.4 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton Broth (MHB)
- 3.1.5.5 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Agar (NA)
- 3.1.5.6 สารละลาย McFarland standard
- 3.1.5.7 อาหารชนิด Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)
- 3.1.5.8 ซีรัม (fetal bovine serum, FBS)
- 3.1.5.9 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin enzyme)
- 3.1.5.10 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline, PBS)
- 3.1.5.11 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO)
- 3.1.5.12 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 70% and 95%)
- 3.1.5.13 สีย้อมทริปแทนบลู (trypan blue)
- 3.1.5.14 เฮกเซน (hexane)
- 3.1.5.15 เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate)
- 3.1.5.16 เมทานอล (methanol)
- 3.1.5.17 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- 3.1.5.18 Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)
- 3.1.5.19 TE buffer
- 3.1.5.20 Chloroform : Isoamyl alcohol (24 :1)
- 3.1.5.21 β – mercaptoethanol
- 3.1.5.22 เอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ (Absolute ethanol)

- 3.1.5.23 ไอโซโพรพานอล (Isopropanol)
 - 3.1.5.24 เอนไซม์ RNaseA เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; Vivantis
 - 3.1.5.25 โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone)
 - 3.1.5.26 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl)
 - 3.1.5.27 ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (*Taq* DNA Polymerase); Biolabs
 - 3.1.5.28 ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟส (Deoxynucleotidetriphosphate, dNTPs); Vivantis
 - 3.1.5.29 บัฟเฟอร์ TBE (Tris Boric EDTA Buffer)
 - 3.1.5.30 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 100 คู่เบส และ 1 กิโลเบส; Vivantis
 - 3.1.5.31 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 50 คู่เบส; Biolabs
 - 3.1.5.32 สีย้อม (loading dye); Vivantis
 - 3.1.5.33 สารละลายเอธิเดียมโบรมไนด์ (ethidium bromide); Vivantis
 - 3.1.5.34 อะกาโรสเจล (agarose gel); Ameresco
 - 3.1.5.35 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
 - 3.1.5.36 น้ำปราศจากไอออน (deionize H₂O)
 - 3.1.5.37 สารละลายกรดเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซิติก (ethylenediaminetetraacetate, EDTA) ; Vivantis
 - 3.1.5.38 Tris-base; Vivantis
 - 3.1.5.39 แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium chloride, MgCl₂); Vivantis
 - 3.1.5.40 ชุด purify สำเร็จรูป GF-1 Ambiclean kit (PCR & Gel); Vivantis
 - 3.1.5.41 ไพร์เมอร์ชนิด decamers ในเทคนิค RAPD
 - 3.1.5.42 ไพร์เมอร์ (primers); (Taberlet et al., 1991)
- C forward: 5'- CGAAATCGGTAGACGCTACG - 3'
- F reverse: 5'- ATTTGAACTGGTGACACGAG - 3'

3.2 วิธีการทดลองระดับโมเลกุล

3.2.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) โดยนำตัวอย่างใบมาล้างทำความสะอาดและปล่อยให้แห้ง นำส่วนใบของตัวอย่างพืชประมาณ 100 มิลลิกรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปแช่ใน CTAB 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมตัวอย่าง และทิ้งไว้ข้ามคืน หรือหากสารละลายมีสีน้ำตาลเข้มให้เปลี่ยนสารละลายใหม่และแช่ตัวอย่างต่อจนสารละลายมีสีน้ำตาลจางลง นำตัวอย่างที่ผ่านการแช่สารละลาย CTAB ใส่ลงในโกร่ง เติมนิโตรเจนเหลวแล้วบดส่วนใบจนละเอียด จากนั้นเติม 2X CTAB buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และเติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิตร หลังจากนั้นใส่ตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วนำมาทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง spin down นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็น

ระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง และกลับหลอดไปมาทุก 15 นาที หรือจนเนื้อเยื่อพืชเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย เมื่อครบเวลาให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาอย่างระมัดระวัง เพื่อหลีกเลี่ยงการขาดของชั้นดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ (บันทึกปริมาตรที่ได้ โดยเฉลี่ยประมาณ 650 ไมโครลิตร) ในขณะที่ดูดควรระวังไม่ให้ดูดส่วนที่เป็นเศษเซลล์หรือโปรตีนขึ้นมา เติม RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30-60 นาที และนำมาเติม CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ (ละลายใน sodium chloride ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex อย่างระมัดระวัง

เติม chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร (หรือปริมาตร 1: 1 ของสารละลายที่ได้) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาอย่างระมัดระวัง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ (บันทึกปริมาตรที่ได้ โดยเฉลี่ยประมาณ 750 ไมโครลิตร) โดยดูดอย่างระวังเพื่อไม่ให้ดูดส่วนที่เป็นเศษเซลล์หรือโปรตีนขึ้นมา เติม isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือในปริมาตร 2/3 ของปริมาตรสารละลายที่ได้ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลามากกว่า 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสออก โดยคว่ำหลอดทดลองบนกระดาษที่ซับน้ำได้ นาน 1-2 นาที เพื่อให้ isopropanol ที่ตกค้างในหลอดไหลลงมา ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็น ethanol ออก ล้างด้วย absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็น ethanol นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้ ethanol ที่ตกค้างอยู่ระเหย ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100-150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอในสารละลาย TE buffer

3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 495 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอ็นเอตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ค่าการเจือจาง หรือ dilution factor เท่ากับ 100) ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วใส่คิวเวตต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน (Blank) ปรากฏค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใช้สำหรับการคำนวณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และ O.D. ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มาใช้คำนวณปริมาณดีเอ็นเอจากค่ามาตรฐานแล้ววัดค่า O.D. ที่ 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1 แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสูตร ปริมาณดีเอ็นเอ = O.D. ที่ 260 นาโนเมตร $\times$ 50 $\times$ dilution factor

3.2.3 การวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ทำโดยซึ่งผงอะกาโรสตามปริมาณที่คำนวณได้ เช่น ต้องการบ่อนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผงวุ้น 0.4 กรัม เติม Tris-borate EDTA (1X TBE buffer) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วทำการละลายโดยใช้ไมโครเวฟจนสารละลายเป็นของเหลวใส จากนั้นรอนจนกว่าอุณหภูมิจะลดลงจนสามารถใช้มือเปล่าสัมผัสขวดที่ใช้ละลายเจลได้ แล้วจึงนำมาเทลงถาดเทเจล (gel tray) ที่มีหัวเสียบเจล (sample combs) เพื่อทำให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอ เมื่อเจลมีการแข็งตัวเรียบร้อยแล้ว ดึงหัวออกและนำไปใส่ลงในอ่างสำหรับรันเจล (chamber) ที่มีสารละลาย TBE buffer 1X อยู่ โดยบัฟเฟอร์นั้นจะมีปริมาตรท่วมผิวหน้าของแผ่นเจล จากนั้นจึงหยอดผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 3-5 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ dye ความเข้มข้น 6X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม เมื่อหยอดผลผลิตพีซีอาร์ครบทุกหลุม รวมทั้งดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 หรือ 100 คู่เบส แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลาประมาณ 30-40 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยการแช่น้ำกลั่น เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออก และนำไปวิเคราะห์ภาพเจลโดยใช้ชุดถ่ายภาพอะกาโรสเจล (gel documentary system) ที่ผ่านเครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transmission)

3.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง trnL intron ระหว่าง trnL (UAA) 5'exon และ trnL (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพรเมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพรเมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) ตาม Taberlet et al. (1991) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ไพรเมอร์ c และ d (Invitrogen) ความเข้มข้นไพรเมอร์ละ 0.8 พิโคโมล (pM) ไดออกซีนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล (μM) ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 40 นาที ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 10 นาที และนำไปวิเคราะห์ภาพเจลโดยใช้เครื่อง Gel documentary system เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.5 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 PCR clean-up kit ภายหลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ซีอาร์แล้ว นำผลิตภัณฑ์ซีอาร์ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ปริมาตร 18 ไมโครลิตร มาปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้เป็น 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม PCR buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลှอนตไปมาเบาๆ ถ้าสีของสารละลายตัวอย่างที่ได้เป็นสีส้ม/ชมพู/แดง ให้เพิ่ม 3 โมลาร์ (M) sodium acetate ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (pH 5.2) สารละลายตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ใน column ออก แล้วทำซ้ำในขั้นตอน PCR buffer อีก 1 ครั้ง ทำการล้าง column ด้วย wash buffer ซึ่งมี ethanol เป็นส่วนประกอบ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ใน column ออก นำ column ที่เทส่วนใสออกแล้ว ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที ขั้นตอนนี้เป็นกำจัด ethanol ที่เหลือให้หมดไป ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ เติม elution buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงใน column ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 นาที สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 8 กิโลเบส ต้องใช้บัฟเฟอร์ที่อุ่นด้วยอุณหภูมิ 65 -70 องศาเซลเซียส จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชะตะกอนดีเอ็นเอได้ดียิ่งขึ้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสร้อยละ 1 เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.2.6 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ซีอาร์ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE DNA Sequencing Division ประเทศมาเลเซีย นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และจัดจำแนกกลุ่ม วิเคราะห์หา phylogenetic tree ทั้งเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับพืชนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง คือทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยโปรแกรม Phylip package version 3.6 ที่รวมการใช้งานหลายโปรแกรม คือ Seqboot, Dnadist, Neighbor และ Consense ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 และใช้วิธี Neighbor-joining เมื่อได้ phylogenetic tree หรือ MEGA 5 จึงกำหนดรูปแบบแผนภูมิด้วยโปรแกรม Tree view version 1.6.6

3.2.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ William et al. (1990) เริ่มต้นจากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ และทำการคัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยนำตัวอย่างมาเพียง 4 ตัวอย่างพร้อมเจือจางดีเอ็นเอของตัวอย่างดังกล่าวให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เติมนสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิค RAPD ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ความเข้มข้นไพรเมอร์ 1 พิโกโมล (pM) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล (μM) ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมล (mM) บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ แล้วผสมด้วยเครื่อง vortex นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้อุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 3.1 เมื่อได้ผลผลิตพีซีอาร์แล้ว นำมาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.1 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค RAPD

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Predenaturing	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	10 รอบ
Annealing	37 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที 45 วินาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
Annealing	56 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที 45 วินาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	7 นาที 30 วินาที	3 รอบ

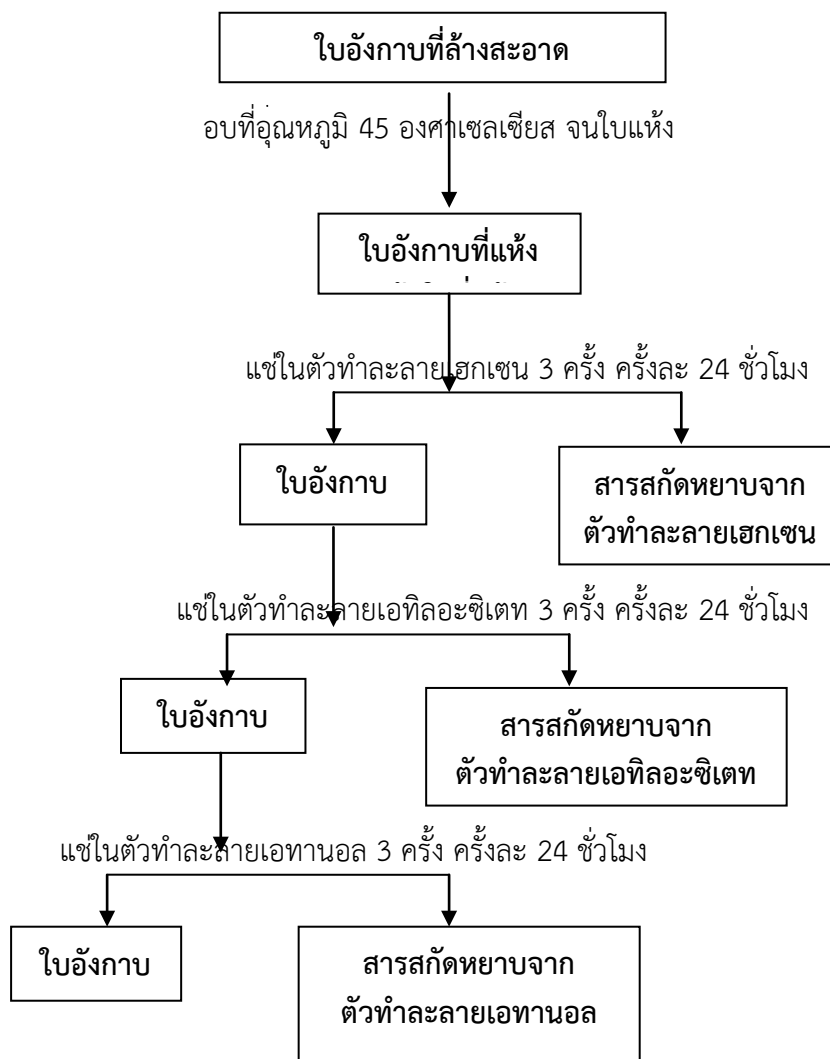
3.2.8 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิคอาร์เอพีดี

แปลผลขนาดชิ้นดีเอ็นเอ หรือแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคอาร์เอพีดีของแต่ละไพรเมอร์ โดยการให้คะแนนแบบ binary โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง นำคะแนนที่เกิดขึ้นโดยใช้ดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index, SI) โดย SI จะมีค่าตั้งแต่ 0-1 โดย SI=0 หมายถึงตัวอย่างที่เปรียบเทียบกับกันไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเลย SI=1 หมายถึงตัวอย่างที่เปรียบเทียบกับกันมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด แล้วนำข้อมูลการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่บันทึกได้นั้นมาหาค่าเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่าง โดยใช้โปรแกรม NTsys ซึ่งจะได้อา SI ค่า SI ที่ได้สามารถนำคำนวณหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากร (Genetic dissimilarity หรือ Genetic distance, D) จาก $D = 1 - SI$ ตามวิธีของ Lynch (1990) แล้วจึงสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Dendrogram)

3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบอังกฤษ

เก็บตัวอย่างใบอังกฤษ นำมาล้างให้สะอาด และทำการผึ่งลมให้แห้งนาน 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 4-5 วัน เพื่อกำจัดความชื้นออกจากตัวอย่าง หรือรอจนกว่าน้ำหนักของตัวอย่างคงที่ เมื่อแห้งสนิทแล้วนำมาบดด้วยมือจะได้ตัวอย่างพืชที่มีลักษณะหยาบ นำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ โดยเริ่มจากนำตัวอย่างพืชห่อด้วยผ้าขาวบาง แล้วแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้อัตราส่วนใบอังกฤษ (กรัม) ต่อปริมาตรตัวทำละลาย (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1: 10 ห่อภาชนะด้วยฟอยด์เพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวอย่างโดนแสง ทำการเขย่าตัวอย่างบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำที่เป็นสารสกัดเก็บในภาชนะสะอาด นำส่วนของใบอังกฤษไปสกัดซ้ำด้วยสารละลายเฮกเซนอีกจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 24 ชั่วโมง โดยเมื่อ 3 ครั้ง นำสารสกัดจากใบอังกฤษที่ได้ทั้งหมดมารองเอาเฉพาะส่วนใสด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ใส่ในขวด pair shape ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และนำไประเหยที่เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ตั้งค่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อระเหยแล้วจะได้ 2 ส่วน คือ ส่วนที่อยู่ใน pair shape เป็นสารสกัดหยาบ (crude) ที่ได้ จะได้สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน และส่วนที่อยู่ใน resovue เป็นตัวทำละลายที่ระเหยได้ นำใบอังกฤษที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายเฮกเซนระเหย จากนั้นนำใบอังกฤษไปสกัดในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ โดยทำวิธีเดียวกันกับการแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และนำสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายใส่ในขวดสีชาขนาดเล็กที่แห้งสนิท และอบฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกน้ำหนักและลักษณะของสาร เก็บในที่เย็น เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป พร้อมนำบางส่วนส่งวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย โดยชั่งสารสกัดหยาบแต่ละตัวทำละลาย 50 มิลลิกรัม นำมาละลายในสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และส่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS)



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion

3.3.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micococcus luteus* ATCC 9341 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Paper disc diffusion ดัดแปลงมาจาก Farhana และคณะ (2009) โดยเชื้อแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton agar (MHA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เชื้อโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาทำให้อยู่ในรูปสารละลายเซลล์แขวนลอย โดยใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton broth (MHB) ปริมาตรหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปตรวจสอบปริมาณของเชื้อ โดยการนำมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620

นาโนเมตร ปรับความชุ่มให้มีค่าประมาณ 0.5 – 1 ซึ่งจะได้เชื้อจุลินทรีย์ประมาณ $10^8 - 10^9$ cfu/ml หรือนำไปเทียบความชุ่มกับสารละลาย McFarland 0.05 เพื่อให้มีเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 1×10^8 cfu/ml จากนั้นใช้ไม้พินสำลีที่นิ่งฆ่าเชื้อจุ่มในเชื้อที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ซับให้แห้งกับข้างหลอดทดลอง นำไปเกลี่ย (swab) บางๆให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาดต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

3.3.2.2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาด

นำสารสกัดหยาดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มาละลายด้วยเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งสารสกัดหยาด 100 มิลลิกรัม จากนั้นเติมเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาดที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางด้วยเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้สารสกัดหยาดที่มีความเข้มข้นเป็น 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดสารสกัดหยาดจากใบอังกาบที่ความเข้มข้น 100, 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

เมื่อได้สารละลายเซลล์แขวนลอยที่มีจำนวนเซลล์ที่ต้องการแล้ว นำไม้พินสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยมาเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารแข็งโดยแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหาร MHA จากนั้นรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการหยดชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) ซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะชนิด gentamycin ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้ตัวทำละลายเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงในกระดาษ AA paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ paper disc จากนั้นรอให้แห้ง หรือทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออก ใช้ปากคีบแผ่น paper disc วางลง และกดเบาๆ บนอาหารในจานเพาะเลี้ยงที่ทำการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว โดยให้สารสกัดหยาด ชุดควบคุมทางบวก และชุดควบคุมทางลบ อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเดียวกัน ตามตำแหน่งที่กำหนด (รูปที่ 2.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของสารสกัดหยาด โดยในการวิเคราะห์ผลการทดลองนั้นจะวิเคราะห์ใน 3 ซ้ำโดยนำมาหาค่าเฉลี่ย และในการวิเคราะห์ทางสถิตินำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง กับกลุ่มควบคุม

3.3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

3.3.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (human breast cancer cell line: MCF7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (human colon adenocarcinoma cell line: HT29) เซลล์ไตลิงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line: Vero cell) เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma cell line:

HepG2) และเซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (human mouth epidermal adenocarcinoma cell line: KB) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร การ subculture นั้นมีวิธีการปฏิบัติดังนี้ นำอาหารเก่าทั้งหมดออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร หลังการนำสารละลาย PBS ออก ใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที ขึ้นกับชนิดของเซลล์ไลน์ เพื่อให้เซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ เมื่อเซลล์ใกล้หลุดโดยเซลล์จะมีลักษณะกลม นำสารละลายเอนไซม์ทริปซินออก และเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสารละลายเอนไซม์ทริปซิน เคาขวดเพาะเลี้ยงเซลล์กับฝ่ามือเบาๆ หรือใช้การดูด-ปล่อยเซลล์เบาๆ แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และใส่อาหารให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

3.3.3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (murine lymphocytic leukemic cell line: P388) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยในการ subculture ทำได้โดยดูดเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนของอาหารเก่าทิ้ง แล้วเขย่าหลอดทดลองเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่ตกตะกอนกระจายตัว จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ ดูดฟันทิ้งให้เข้ากัน จากนั้นดูดเซลล์ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือนำอาหารเก่าและเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในกรณีที่มีเซลล์จำนวนน้อย และปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ในกรณีที่มีเซลล์จำนวนมาก และใส่อาหารให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

3.3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT assay

3.3.4.1 การปลูกเซลล์ใน 96 - wells plate

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีการจาก Mosmarin (1983) และ Hussain และคณะ (1993) ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 6 ชนิด ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารดังที่กล่าวมาแล้ว ในเซลล์ชนิดเกาะพื้นผิวทำการ trypsinization ด้วยทริปซินที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับเซลล์ชนิด P388 เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มีซีรั่ม 10 เปอร์เซ็นต์ นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งมาทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีทรูปแฟนบลู จากนั้นปลูกเซลล์ โดยเซลล์ชนิด P388 เริ่มต้นปลูกเซลล์จำนวน 0.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร MCF7 และ KB เริ่มต้นปลูกเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ HT29 HepG2 และ Vero cell เริ่มต้นจำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร ($0.8-1.5 \times 10^4$ เซลล์ต่อหลุม) ลงใน 96-wells plate หลังจาก

นั้นนำไปป้อนในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4.2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มาละลายด้วย DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ โดยซึ่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม จากนั้นใส่ DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4800 ไมโครลิตร และทำการกรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 4000, 2000, 1000, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 - wells plate ครบ 24 ชั่วโมง นำมาลงสารสกัดหยาบในระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีหลุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ต้องใส่สารสกัดหยาบแต่ใส่อาหารใหม่ที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control) หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็น blank หลุมที่ใส่ DMSO ที่เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) ในการตรวจสอบว่าผลการทดลองเป็นผลมาจาก DMSO หรือไม่ และหลุมที่ใส่สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารละลาย MitomycinC (MMC) เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) โดยต้องมีการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนการนำมาใช้ จากนั้นนำไปป้อนในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เมื่อป้อนเซลล์ในสารสกัดหยาบเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง นำ 96 - wells plate มาใส่สารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นหุ้ม 96 - wells plate ด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อป้องกันแสง นำไปป้อนต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารที่มีสารละลาย MTT โดยใช้เครื่องดูดสาร หรือการคว่ำลงเบาๆบนกระดาษซับ จากนั้นละลายผลึกฟอร์มาซานโดยเติมสารละลาย DMSO: ethanol 95% ปริมาตร 1: 1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ วาดกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด และความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ในแกน y และ x ตามลำดับ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่าการมีชีวิตของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (50% cytotoxicity: CC₅₀)