

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมีและสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อยู่ในระดับ Analytical grade หรือ HPLC grade ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid (HPLC grade)	Merck
Acetronitrite (HPLC grade)	Labscan
Adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulphate	Sigma
L-Ascorbic acid	Fisher
Biliverdin reductase	Sigma
Boric acid	Scharlau
Bovine serum albumin	Sigma
Catechin	Sigma
Cell proliferation reagent WST-1	Roche
Curcumin	Sigma
Cyanidine-3-glucoside	Extrasynthase
Dichloromethane (HPLC grade)	Merck
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen
Ethidium bromide	Vivantis
Ethyl acetate	J.T. Baker
Ethylene diamine tetra acetate (EDTA)	Fisher
Ferrous sulphate	Sigma
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco
Folin-Ciocalteu reagent	Merck

ตารางที่ 1 สารเคมีและสารมาตรฐาน (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Formaldehyde	Merck
Gallic acid	Sigma
Gamma-oryzanol	Wako
Heme	Sigma
Hexane	Labscan
Hydrochloric acid	Merck
Human total COX-2 immunoassay	R&D System
Human total TNF- α immunoassay	R&D System
Hydrogen peroxide	Sigma
Interferon- γ (IFN- γ)	Sigma
Linoleic acid	Fisher
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma
Mercaptoethanol	Invitrogen
Methanol (HPLC grade)	Labscan
Naphthylethylenediamine dihydrochloride	Fluka
Reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide dinucleotide (NADH)	Sigma
<i>p</i> -Nitrophenyl sulphate	Sigma
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma
Phenazin methosulfate (PMS)	Sigma
Phenylmethylsulfonyl fluoride	Sigma
Phosphate buffer saline	Invitrogen
Phosphate buffer saline without Ca ²⁺ and Mg ²⁺	Invitrogen
Plasmid DNA pUC18	Vivantis
Potassium chloride	Merck
RPMI medium	Invitrogen
Rutin	Sigma
Silica gel GF254	Merck
Sodium bicarbonate	Merck

ตารางที่ 1 สารเคมีและสารมาตรฐาน (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Sodium hydroxide	Merck
Sodium nitroprusside	Fisher
Sulphanilamide	Fisher
1,1,3,3-Tetramethoxypropane	Sigma
Thiobarbituric acid	Fisher
Tocotrienol	Wako
Tocopherol	Wako
Tris	Amersham
Trichloroacetic acid	Fisher
Tumor necrosis factor- α	Life Science
Tween-20	Fisher

3.2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ดังแสดงในตารางที่

2

ตารางที่ 2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	Shimadzu
เครื่องระเหยโดยการลดความดัน	Buchi
เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance)	Sartorius
Biohazard hood	CTL
Cell culture flask	Falcon
Centrifuge	Hermle
CO ₂ Incubator	Memmert
Microcentrifuge	Hanil

ตารางที่ 2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ (ต่อ)

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Micropipette	Gilson
Microplate reader	Beckman Coulter
pH meter	Metrohm
Spectrophotometer	Jasco
Water bath	Mettler

3.3 การคัดเลือกตัวอย่างข้าว

ทำการคัดเลือกตัวอย่างข้าวจากศูนย์วิจัยข้าวในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย โดยแบ่งตัวอย่างข้าวที่ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ข้าวเก่า ข้าวแดงและข้าวขาว อย่างน้อยกลุ่มละ 3 สายพันธุ์ แล้วนำมาสีเป็นข้าวกล้องด้วยเครื่องสีข้าวทองทวี รุ่น 1000 TURBO รายชื่อสายพันธุ์ข้าวดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 รายชื่อสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการวิจัย

กลุ่มข้าว	สายพันธุ์	แหล่งที่มา
ข้าวขาว	ข้าวสันป่าตอง 1	ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
	ข้าวชัยนาท 2	ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
	ข้าวชัยนาท 1	ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
	ข้าวดอกมะลิ 105	ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
	ข้าวชิวแม่จัน	ศูนย์วิจัยข้าวสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่
ข้าวแดง	ข้าวเหนียวแดง	สำนักงานเกษตรอำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่
	ข้าวกล้า	สำนักงานเกษตรอำเภอแม่ระมาด จังหวัดตาก
	ข้าวแดงสุโขทัย 1	ศูนย์เกษตรอินทรีย์ สนามบินสุโขทัย อำเภอเมือง จังหวัดสุโขทัย
ข้าวเก่า	ข้าวเหนียวดำ	สำนักงานเกษตรอำเภอพบพระ จังหวัดตาก
	ข้าวเก่าต่อ	สำนักงานเกษตรอำเภอพบพระ จังหวัดตาก
	ข้าวดำสุโขทัย 1	ศูนย์เกษตรอินทรีย์ สนามบินสุโขทัย อำเภอเมือง จังหวัดสุโขทัย
	ข้าวเก่าปาอีตอย	ศูนย์วิจัยข้าวปางมะผ้า จังหวัดแม่ฮ่องสอน
	ข้าวเก่าบึง	สำนักงานเกษตรอำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก



ข้าวดำสุโขทัย 1



ข้าวกำต๋อ



ข้าวเหนียวดำ



ข้าวกำบั้ง



ข้าวแดงสุโขทัย 1



ข้าวเหนียวแดง

รูปที่ 3 ตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ใช้การการศึกษาวิจัย



ข้าวกล้า



ข้าวชิวแม่จัน



ข้าวชัยนาท 1



ข้าวสันป่าตอง 1



ข้าวดอกมะลิ 105



ข้าวชัยนาท 2

รูปที่ 3 ตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ใช้การการศึกษาวิจัย (ต่อ)

3.4 การสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้คัดเลือกจากศูนย์วิจัยข้าวในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย

การสกัดแยกสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลได้ดัดแปลงวิธีของ Xu and Godber (1999) ดังนี้
เมล็ดข้าวน้ำหนัก 200 กรัม บดให้ละเอียด



ใช้เฮกเซน/เอธิลอะซีเตต อัตราส่วน 7:3 สกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet's extraction)
นาน 3 ชั่วโมง



ระเหยโดยการลดความดัน ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน



สารสกัดหยาบ (crude rice oil extract)



เก็บในภาชนะกันแสงและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



สารสกัดหยาบ 1 กรัม



โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ Silica gel GF254 เป็นวัสดุภาคคงที่



วัสดุภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย เฮกเซน/เอธิลอะซีเตต ในอัตราส่วน 9:1, 7:3 และ 1:1 โดยปริมาตร
ตามลำดับ



เก็บสารละลายที่ได้ในแต่ละอัตราส่วนของวัสดุภาคเคลื่อนที่



ระเหยโดยการลดความดัน



เก็บในภาชนะกันแสงและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



วิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอโรซานอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ไฮโรซานอล ปริมาณฟีนอลิกโดยรวม ปริมาณแอนโธไซยานินโดยรวม ปริมาณโทโคไตรอินอลและโทโคเฟอร์รอล

3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ไฮโรซานอล

การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ไฮโรซานอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้วิเคราะห์ตามวิธีของ Xu and Godber (1999) โดยใช้เครื่อง HPLC ซึ่งประกอบด้วย LC-10AV VP pumps และ SPD-10AV VP อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Methanol : Acetonitrile : Dichloromethane : Acetic acid เท่ากับ 50 : 44 : 3 : 3 โดยปริมาตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Flow rate) เท่ากับ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ Alltech C18 column และ UV detector ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกโดยรวม (Total phenolic content)

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Dewanto *et al.*, 2002) โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอล ในการเปลี่ยนสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีสีเหลือง (Molybdotung-stophosphoric heteropolyanion reagent) ในสถานะที่เป็นต่างให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Molybdotungstophosphate blue) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

เตรียม Folin-Ciocalteu stock solution และ Sodium bicarbonate



เตรียม Gallic acid ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน



เตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



Reaction mixture ประกอบด้วยน้ำปราศจากไอออน 1.5 มิลลิลิตร สารละลาย Sodium bicarbonate

300 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตรและสารละลายตัวอย่าง

หรือสารมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร



วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UVVIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร



คำนวณหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกโดยรวมของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน Gallic acid



3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยรวม

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยรวมนั้นจะวิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวเก่า เนื่องจากสารกลุ่มนี้จะพบเฉพาะในข้าวที่มีสีม่วงหรือดำ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.* (2005) โดยวัดจากการดูดกลืนแสงเทียบกับสารละลายแอนโทไซยานินมาตรฐาน ดังนี้

เตรียมตัวอย่างโดยใช้สารละลาย 0.1 N กรดไฮโดรคลอริก

ปรับค่าความกรดต่างให้ได้เท่ากับ 1.0 และ 4.5



เตรียมสารละลาย Cyanidine-3-glucoside ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0

มิลลิโมลาร์ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน



เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



Reaction mixture ประกอบด้วยสารละลายตัวอย่างในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 1.0 และ 4.5



นำไปตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง UV/VIS-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร



คำนวณหาปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยรวมของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

Cyanidine-3-glucoside

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณโทโคไตรอินอลและโทโคเฟอร์รอล

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโทโคไตรอินอลและโทโคเฟอร์รอลทั้ง 4 รูปแบบคือ α , γ , β , และ δ ด้วยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ได้ทำการดัดแปลงจากวิธีการของ Britz *et al.* (2007) และ Jang and Xu (2009) โดยสภาวะที่ใช้วิเคราะห์ประกอบด้วยคอลัมน์ RP-Column C-30 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร) ขนาดของวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้เทคนิค Gradient elution โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย Acetonitrile:Methanol:DI Water ในอัตราส่วน 85:12:3 โดยปริมาตร อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาทีและใช้ค่าความยาวคลื่น 293 นาโนเมตรในการวิเคราะห์

3.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.6.1 การประเมินฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์

อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (ROS) โดยเกิดขึ้นได้จากกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรีย สำหรับการศึกษาค้างนี้จะใช้ระบบ NADH-Phenazine methosulphate (PMS) ในการสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ จากนั้นวิเคราะห์อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นด้วยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Nitroblue tetrazolium (NBT) โดยทำการวิเคราะห์ reduced NBT ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร (Yanping *et al.*, 2004) ดังนี้

เตรียมสารละลาย NADH, NBT, และ EDTA ใน PBS buffer (pH 7.4)

ใน 96-wells plate



เติมสารละลายสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

ความเข้มข้น 50, 100, 200, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



เติมสารละลาย PMS เพื่อเริ่มปฏิกิริยา



ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

โดยใช้เครื่อง Microplate reader

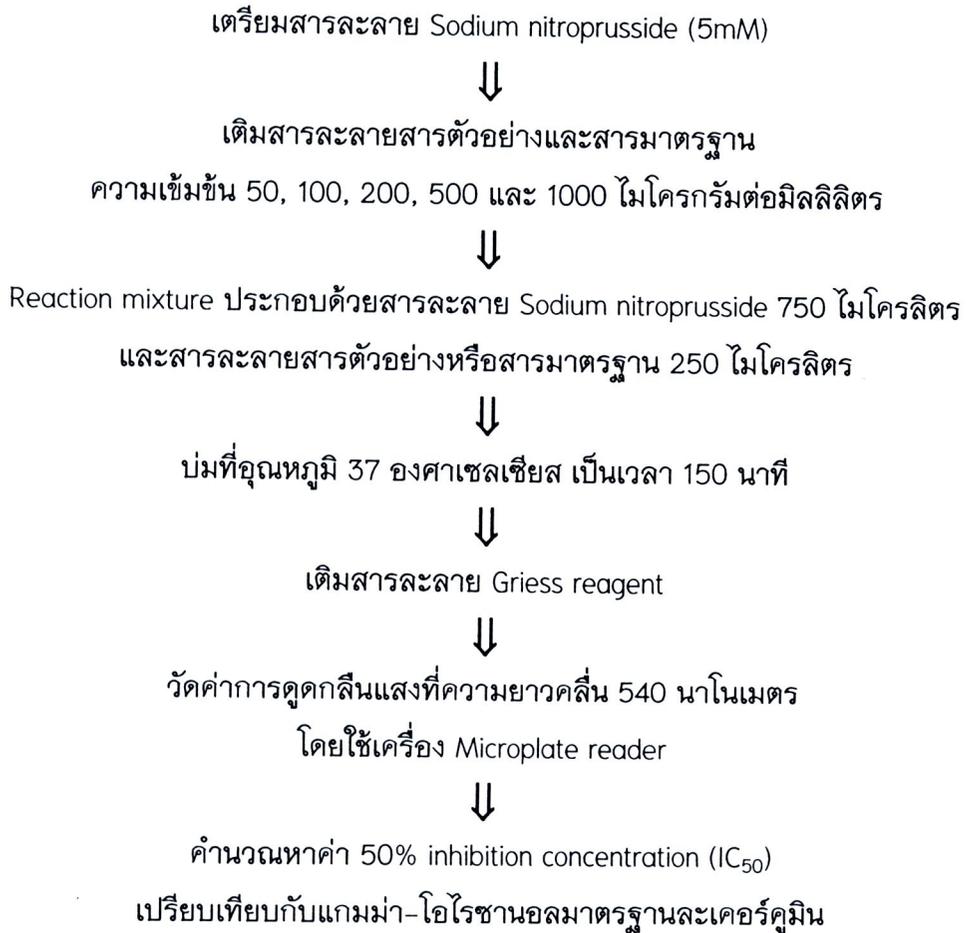


คำนวณหาค่า 50% inhibition concentration (IC₅₀)

เปรียบเทียบกับแกมมา-ไอโรซานอลมาตรฐาน, L-Ascorbic acid และ Rutin

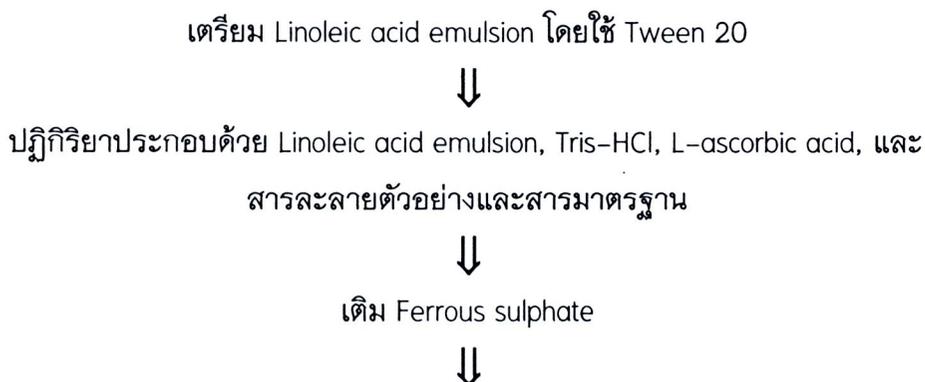
3.6.2 การประเมินฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์

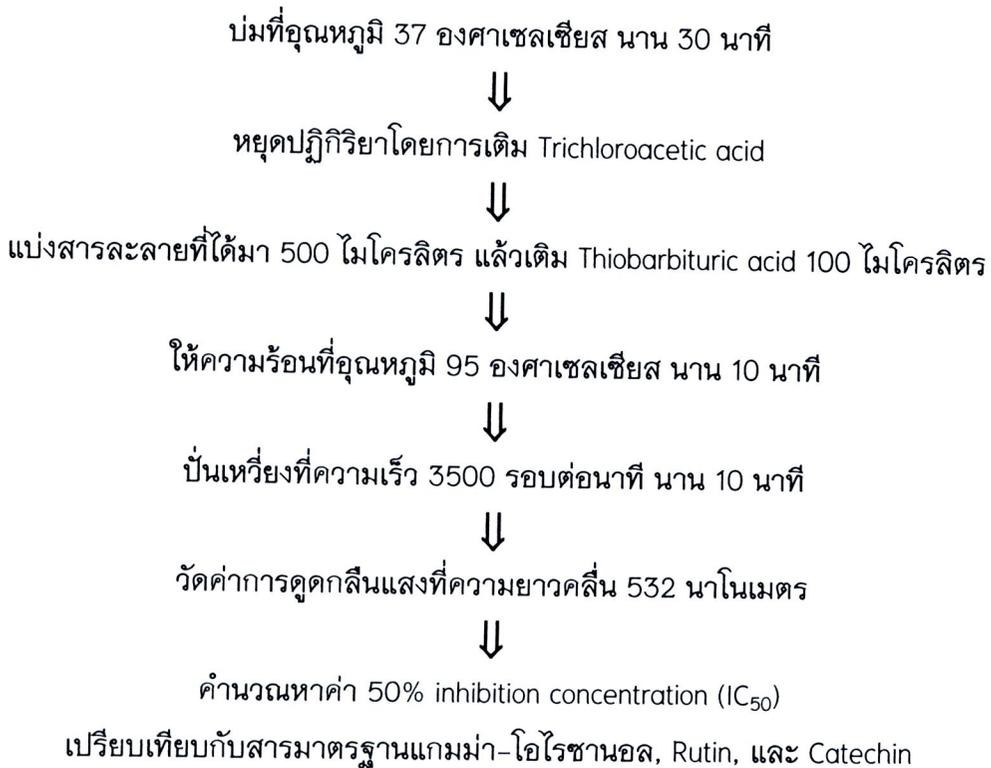
ในการศึกษาค้างนี้ อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ถูกสร้างมาจาก Sodium nitroprusside จากนั้นอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็น Nitrite ions ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วย Griess reagent ถ้าสามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ได้ก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จะทำให้ปริมาณของ Nitrite ion ลดลง (Saenjum *et al.*, 2010) ดังนี้



3.6.3 การประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน

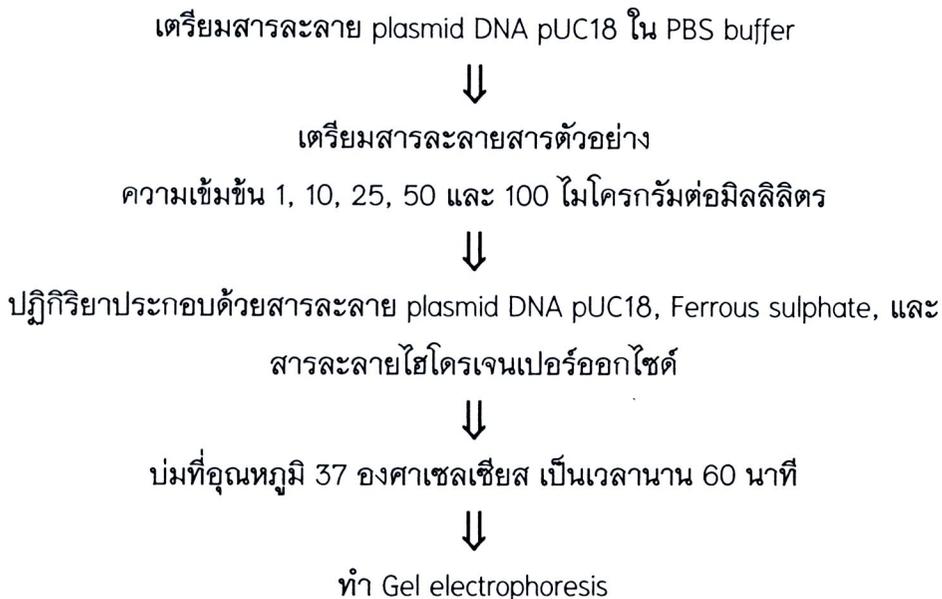
การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันเป็นกลไกที่ดีที่แสดงถึงการบาดเจ็บของเซลล์ โดยสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ ในการประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันครั้งนี้จะใช้เทคนิค Linoleic acid peroxidation ซึ่งดัดแปลงมาจาก Choi et al., (2002) ดังนี้





3.6.4 การศึกษาความสามารถในการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอโดยอนุมูลอิสระ

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้หลักการการสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจากปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction) โดยใช้ Plasmid DNA pUC18 เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบความสามารถป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Saenjum *et al.*, 2010) ดังนี้





ตรึงด้วย Ethidium bromide



วิเคราะห์ความเข้มสีของ DNA band ด้วย Gel documentation
เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกมมา-ไอโรซานอลและ Quercetin

3.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดแกมมา-ไอโรซานอลจากข้าวไทย จะประเมินผ่านการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 และการยับยั้งการสร้าง TNF- α ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HT-29 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (Lipopolysaccharide and interferon- γ) ที่เลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่มีส่วนผสมของเพนนิซิลินและสเตรพโทไมซิน

3.7.1 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (COX-2)

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (COX-2) ใช้ชุดวิเคราะห์ Human total COX-2 Immunoassay ดังนี้

เลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HT-29 ใน Black 96-well plate

หลุมละ 1×10^5 เซลล์



บ่มในสภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง



เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนประกอบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



เติมสารละลายสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ



บ่มในสภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง



เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนประกอบของ 4% Formaldehyde



บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 20 นาที



ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 3 ครั้ง



เติม Quenching buffer 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 20 นาที



ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 3 ครั้ง



เติม Blocking buffer 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง



ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 3 ครั้ง



เติม Antibody mixture (ประกอบด้วย HRP-conjugated antibody และ AP-conjugated antibody)

100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง



ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 3 ครั้ง



เติม Substrate F1 75 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 60 นาที



เติม Substrate F2 75 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 30 นาที



วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ Excitation wavelength 540 นาโนเมตร

และ Emission wavelength 600 นาโนเมตร



วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)



วิเคราะห์ Cell viability ด้วย Cell proliferation WST-1 ตามวิธีของ Jarray *et al.* (2011)

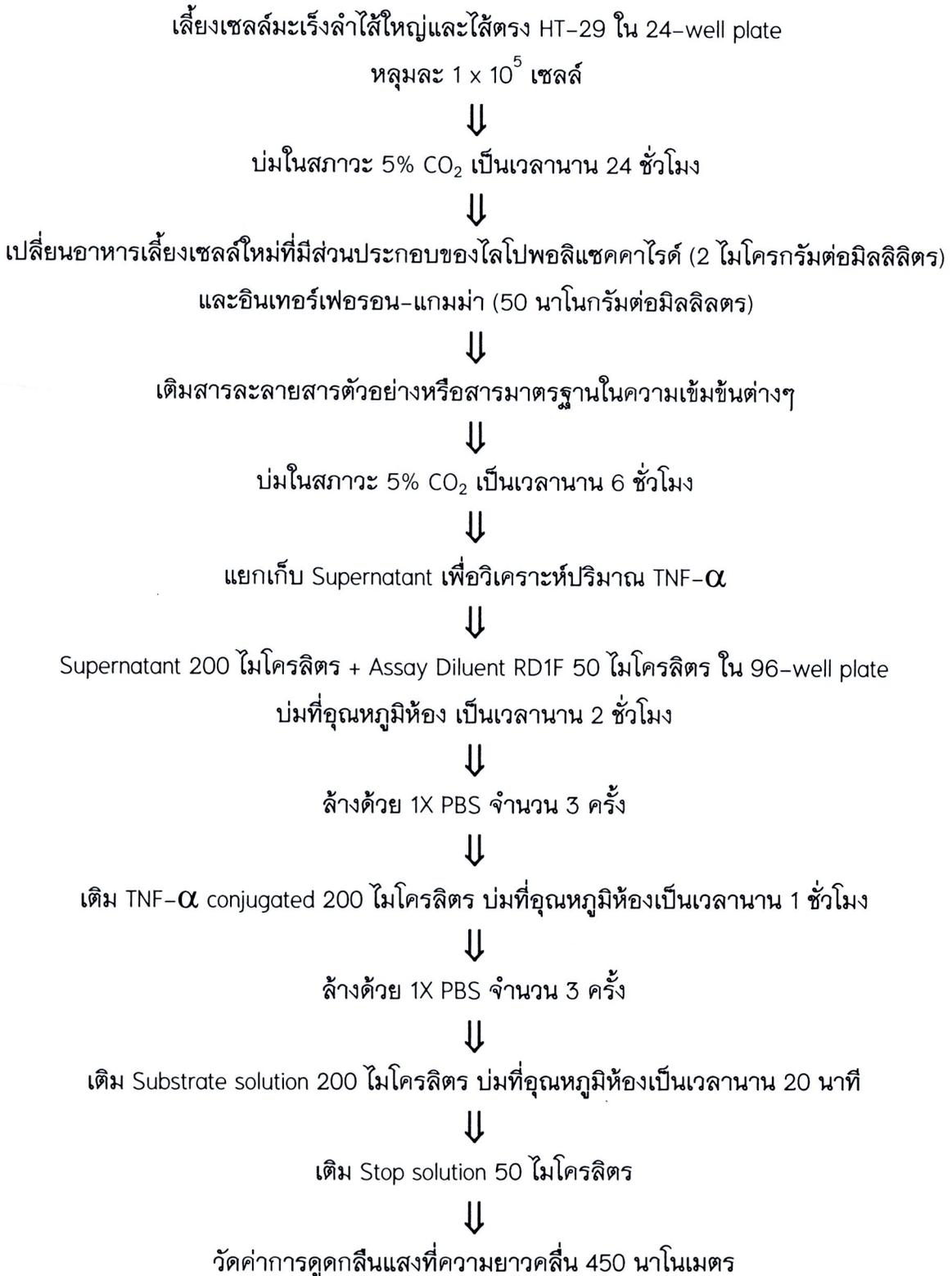


คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส-2

ได้ร้อยละ 50 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.7.2 การยับยั้งการสร้างทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา (TNF- α)

การวิเคราะห์ปริมาณ TNF- α ใช้ชุดวิเคราะห์ Human total TNF- α Immunoassay ดังนี้



วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)



วิเคราะห์ Cell viability ด้วย Cell proliferation WST-1 ตามวิธีของ Jarray *et al.* (2011)



คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้าง TNF- α

ได้ร้อยละ 50 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.8 การศึกษาการกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส (SULT)

เอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส (SULT) เป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งของกระบวนการกำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งของเอนไซม์ Phase II การศึกษาการกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส (SULT) ทดสอบโดยใช้เซลล์มะเร็งตับ Hep G2 โดยดัดแปลงวิธีจาก Frame *et al.* (2002) และ Huber *et al.* (2008) ดังนี้

เลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ใน 6-well plate หลุมละ 5×10^5 เซลล์



บ่มในสภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง



เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ



วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส (SULT) ณ เวลา 0, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง



เก็บเซลล์เพาะเลี้ยงที่เวลาข้างต้น ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 3 ครั้ง



เติม Lysis buffer 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Mercaptoethanol,

Phenylmethylsulfonyl fluoride, Tris, Sucrose



ปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วเก็บส่วน Supernatant



Supernatant 50 ไมโครลิตร + Reaction mixture 100 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย

Potassium phosphate buffer (pH 6.5), MgCl₂, *p*-nitrophenyl sulphate และ

adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS)

↓
 ↓
 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 45 นาที

↓
 ↓
 เติมนัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8.7) 100 ไมโครลิตร

↓
 ↓
 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร
 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

↓
 ↓
 วิเคราะห์ Cell viability ด้วย Cell proliferation WST-1 ตามวิธีของ Jarray *et al.* (2011)

3.9 การศึกษาการกระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 (HO-1)

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 ได้ทำการดัดแปลงจากวิธีของ Kikuchi and Yochida (1998) ดังนี้

เลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ใน 6-well plate หลุมละ 5×10^5 เซลล์

↓
 ↓
 บ่มในสภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

↓
 ↓
 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ

↓
 ↓
 วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 (HO-1) ณ เวลา 0, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง

↓
 ↓
 เก็บเซลล์เพาะเลี้ยงที่เวลาข้างต้น ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 3 ครั้ง

↓
 ↓
 เติม Lysis buffer 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Mercaptoethanol,
 Phenylmethylsulfonyl fluoride, Tris, Sucrose

↓
 ↓
 บั่นเหวี่ยงที่ 105,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 60 นาที แล้วเก็บส่วนที่ตกตะกอน

↓
 ↓
 ล้างตะกอนด้วย 1 โมลาร์ KCl ซึ่งประกอบด้วย 0.02 มิลลิโมลาร์ Potassium persulphate buffer
 และ 10 มิลลิโมลาร์ EDTA



ปั่นเหวี่ยงที่ 105,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 60 นาที แล้วเก็บส่วนที่ตกตะกอน



เติม 50 มิลลิโมลาร์ Potassium persulphate buffer โดยคำนวณให้มีปริมาณโปรตีน
อยู่ที่ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



Reaction mixture ประกอบด้วย 1 โมลาร์ Potassium phosphate beffer (pH 7.4), 1 mM Heme,
Biliverdin reductase, Bovine serum albumin, สารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน



เขย่าใน Shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 10 นาที



เติม 10 มิลลิโมลาร์ NAPPH แล้วบ่มเป็นเวลานาน 2 นาที



หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำ Reaction mixture ใส่ลงในถังน้ำแข็ง



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร