วิธีการทดลอง

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การทดสอบความเป็นพิษใช้วิธีการ MTT assay โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน $1x10^4$ cells ต่อ 100 µl ต่อ well ใน 96 well-plate เป็นเวลา 24 ชม จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่จำนวน 90 ไมโครลิตร แล้วเติมด้วยสาร MTT solution (5 mg/ml in phosphate buffer saline (PBS)) จำนวน 10 ไมโครลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 2 ชม ที่ 37 °C เมื่อครบเวลาจึงดูดสารในแต่ละช่องออกแล้วเติมด้วย DMSO จำนวน 150 ไมโครลิตร เพื่อละลายสาร formazan ในแต่ละช่อง การเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นวัดด้วย ELISA plate reader (Multiskan, Finland) ที่ความยาวคลื่น OD_{540}

2. การศึกษาลักษณะภายนอกและการหดตัวของโครมาติน

ใช้เซลล์ตั้งต้นที่ 1X 10^6 เซลล์ ต่อหลุม ของจานอาหารเลี้ยงเซลล์ประเภท 6 หลุม (6 well-plate) จากนั้นทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากสมุนไพรซาไก ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 2 เท่าของค่า IC_{50}) เป็นเวลา 0 3 5 และ 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO_2 เท่ากับ 5 % จากนั้นทำการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกโดยบันทึกภาพด้วยกล้อง inverted microscope ที่เลนส์วัตถุ 10X สำหรับลักษณะของโครมาตินศึกษาโดยย้อมด้วย DAPI ซึ่งเป็นสีที่ย้อมติดดีเอ็นเอและบันทึกภาพด้วย fluorescence microscope

3. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และผลของ caspase-3, caspase-8 และ caspase-9 inhibitors ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3

ใช้เซลล์ตั้งต้นที่ 1X 10^6 เซลล์ ต่อหลุม ของ จานอาหารเลี้ยงเซลล์ประเภท 6 หลุม (6 well-plate) ทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากสมุนไพรซาไก ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 2 เท่าของค่า IC_{50}) เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO_2 เท่ากับ 5 % สำหรับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบผลของ caspase-3, caspase-8 และ caspase-9 inhibitors ทดสอบโดยเติมตัวยับยั้งเหล่านี้ในเซลล์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 mM และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO_2 เท่ากับ 5 % เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเติมสารสกัดจากสมุนไพรซาไก ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการบ่มต่อเป็น 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO_2 เท่ากับ 5 % เมื่อครบเวลาตามกำหนดเวลาทำการเก็บเซลล์ด้วยวิธี trysinization นำเซลล์ที่ได้ล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS แล้วนำตะกอนเซลล์วัดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 หรือเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะพร้อมวัดการทำงานของเอนไซม์

การวัดการทำงานของ caspase-3 ใช้วิธีการเติมสาร fluorogenic substrate ที่มีความจำเพาะต่อ caspase-3 (AMC-DEVD) แล้ววัดผลผลิตซึ่งเป็นสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader ทุกๆ 10 นาที เป็นเวลาทั้งหมด 100 นาที นำค่า slope ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างใช้ในการ plot graph

4. การหลั่งของ cytochrome c ออกจากไมโตคอนเดรีย และการตรวจสอบ Bid cleavage ด้วยวิธี western blotting

นำเซลล์จำนวน $1x10^6$ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรซาไกแล้วมาเติมด้วย lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2.6H_2O$, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose และ protease inhibitor cocktail) (Sigma, USA) จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที lysate ที่ได้นำมาปั่นที่ 500xg ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ส่วนของน้ำใสที่แยกได้นำมาปั่นที่ 10,000xg 4 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกส่วนของ cytosol (supernatant) และ mitochondrial fraction (pellet) หลังจากนั้นจึงนำส่วนที่เตรียมได้มาวัดปริมาณโปรตีน โดยใช้ปริมาณ 30 µg วิเคราะห์ใน 12% SDS-PAGE แล้วทำการ transfer โปรตีนในแผ่นเจลไปที่ PVDF membrane (Millipore, USA) แล้วทำการตรวจสอบผลด้วย primary antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ และ Secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย peroxidase จากนั้นตรวจสอบผลด้วย Supersignal chemiluminescent kit (Pierce, USA)

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง ด้วยวิธี RT-PCR

เก็บเซลล์จำนวน $1x10^6$ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรซาไกแล้วมาล้างด้วย PBS จากนั้นนำมาเตรียม RNA ด้วย Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbed, USA) หลังจากนั้นนำ tctal RNA 1 ไมโครกรัม มาสร้างเป็น cDNA โดยใช้ Oligo dT_{12-18} primer (Invitrogen, Carlsbed, USA) และ Superscript III One-Step RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbed, USA) โดยในกระบวนการเพิ่มปริมาณ cDNA จะมีการเติม 2x first stand buffer, 0.1M DDT 40U RNAseOUT RNAse-inhibitor (Invitrogen, Carlsbed, USA) และ 200U reverse transcriptase ให้มี final volume ที่ 20 µl จากนั้นจึงบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 90 นาที และบ่มในรอบสุดท้ายที่ 70°C เป็นเวลา 15 นาที cDNA fragments ที่ได้นำมาตรวจหาปริมาณของยีนที่ต้องการโดยใช้ condition ต่อไปนี้ คือ pre-denaturation at 94°C เป็นเวลา 3 นาที, 35 cycles ที่ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที, 40-55°C เป็นเวลา 45 วินาที, 72°C เป็นเวลา 60 วินาที และตามด้วย elongation ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อดำเนินการครบกระบวนการแล้วนำ PCR products จำนวน 10 ไมโครลิตรมาตรวจสอบผลใน 1.5% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide staining โดยกระบวนการ PCR จะทำโดยใช้เครื่องมือ MJ research (Model PTC-200, Massachusetts, USA)