

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

จากการรวบรวมเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่แยกได้จากแมลงและดินในประเทศไทย จำนวนทั้งหมด 29 ไอโซเลต นำมาระบุสปีชีส์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากลักษณะของโคโลนี และจากอัตราส่วนความยาวและความกว้างของสปอร์ และเทคนิคทางโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) และบางส่วนของ 18S และ 28S ของ rDNA (ribosomal DNA) โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ PN3/PN16 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HhaI* (*AspI*EI) สามารถแยกเป็นเชื้อรา *Beauveria bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต และเชื้อรา *Beauveria brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลต

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2.1.2.2 *Escherichia coli* DMST 4212

2.1.2.3 *Staphylococcus aureus* TISTR 118

2.1.2.4 *Bacillus cereus* DMST 5040

2.1.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1.3.1 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7)

2.1.3.2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29)

2.1.3.3 เซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell)

2.1.3.4 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: P388)

2.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1.4.1 บีกเกอร์ (beaker)

2.1.4.2 กระจกบอขวด (cylinder)

2.1.4.3 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

2.1.4.4 ขวดแก้ว (bottle) ขนาดต่างๆ

2.1.4.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

2.1.4.6 แท่งแกว่ง (spreader)

2.1.4.7 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (needle)

2.1.4.8 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมงอ (hook)

2.1.4.9 ห่วงเขี่ยเชื้อปลายกลม (loop)

2.1.4.10 คอกบอร์เรอร์ (cock borer)

2.1.4.11 ปากคีบ (forceps)

2.1.4.12 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร

- 2.1.4.13 ลูกยาง (rubber bulb)
- 2.1.4.14 ช้อนตักสารเคมี (spatular)
- 2.1.4.15 คาร์ลิเปอร์ชนิดอัตโนมัติ (digital caliper)
- 2.1.4.16 ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 2.1.4.17 ปิเปตแบบอัตโนมัติ (pipette boy)
- 2.1.4.18 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
- 2.1.4.19 ทิป (tip) ขนาดต่างๆ
- 2.1.4.20 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (flask)
- 2.1.4.21 ตะเกียง (burner)
- 2.1.4.22 สไลด์แก้ว (glass slide)
- 2.1.4.23 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)
- 2.1.4.24 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)
- 2.1.4.25 ชุดอุปกรณ์การกรองพร้อมกระดาษกรองขนาด 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร
- 2.1.4.26 เครื่องระเหยสูญญากาศ (evaporator)
- 2.1.4.27 ไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ (microtiter plate reader) ฟิลเตอร์ (filter) สำหรับความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร
- 2.1.4.28 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 2.1.4.29 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- 2.1.4.30 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 2.1.4.31 ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)
- 2.1.4.32 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 2.1.4.33 กล้องจุลทรรศน์ชนิด bright field
- 2.1.4.34 กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted
- 2.1.4.35 เครื่องชั่ง (balance)
- 2.1.4.36 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)
- 2.1.4.37 เครื่องช่วยผสม (vortex)
- 2.1.4.38 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 2.1.4.39 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 2.1.4.40 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)
- 2.1.5 วัสดุ และสารเคมี
- 2.1.5.1 ยาปฏิชีวนะ gentamycin
- 2.1.5.2 สาร beauvericin (Sigma)
- 2.1.5.3 สาร mitomycin C
- 2.1.5.4 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton agar (MHA) และ Mueller-Hilton Broth (MHB)
- 2.1.5.5 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato Dextrose Agar (PDA) และ Potato Dextrose Broth (PDB)
- 2.1.5.6 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Malt Extract Agar (MEA)



- 2.1.5.7 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Corn Meal Agar (CMA)
- 2.1.5.8 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Yeast Extract Sucrose (YES)
- 2.1.5.9 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Yeast-Malt Extract Agar (YMA)
- 2.1.5.10 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
- 2.1.5.11 สารละลาย McFarland standard
- 2.1.5.12 อาหารชนิด Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)
- 2.1.5.13 ซีรัม (fetal bovine serum, FBS)
- 2.1.5.14 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin enzyme)
- 2.1.5.15 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO)
- 2.1.5.16 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 70% and 95%)
- 2.1.5.17 ไฟโตฮีแมกกลูตินิน (phytohemagglutinin-M, PHA)
- 2.1.5.18 เฮปาริน (heparin)
- 2.1.5.19 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride)
- 2.1.5.20 น้ำยาคงสภาพ (fixative solution) ชนิด 3 Methanol: 1 Acetic acid
- 2.1.5.21 โคลซิמיד (colcemid)
- 2.1.5.22 ฟอสเฟตไวน์บัฟเฟอร์ (phosphate wise buffer)
- 2.1.5.23 สีย้อมจิมซ่า (giemsa)
- 2.1.5.24 สีย้อมทริปแพนบลู (trypan blue)
- 2.1.5.25 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline: PBS)
- 2.1.5.26 เฮกเซน (hexane)
- 2.1.5.27 เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate)
- 2.1.5.28 เมทานอล (methanol)
- 2.1.5.29 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- 2.1.5.30 Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry
- 2.1.5.31 น้ำกลั่น (distilled water)

2.2 วิธีการทดลอง

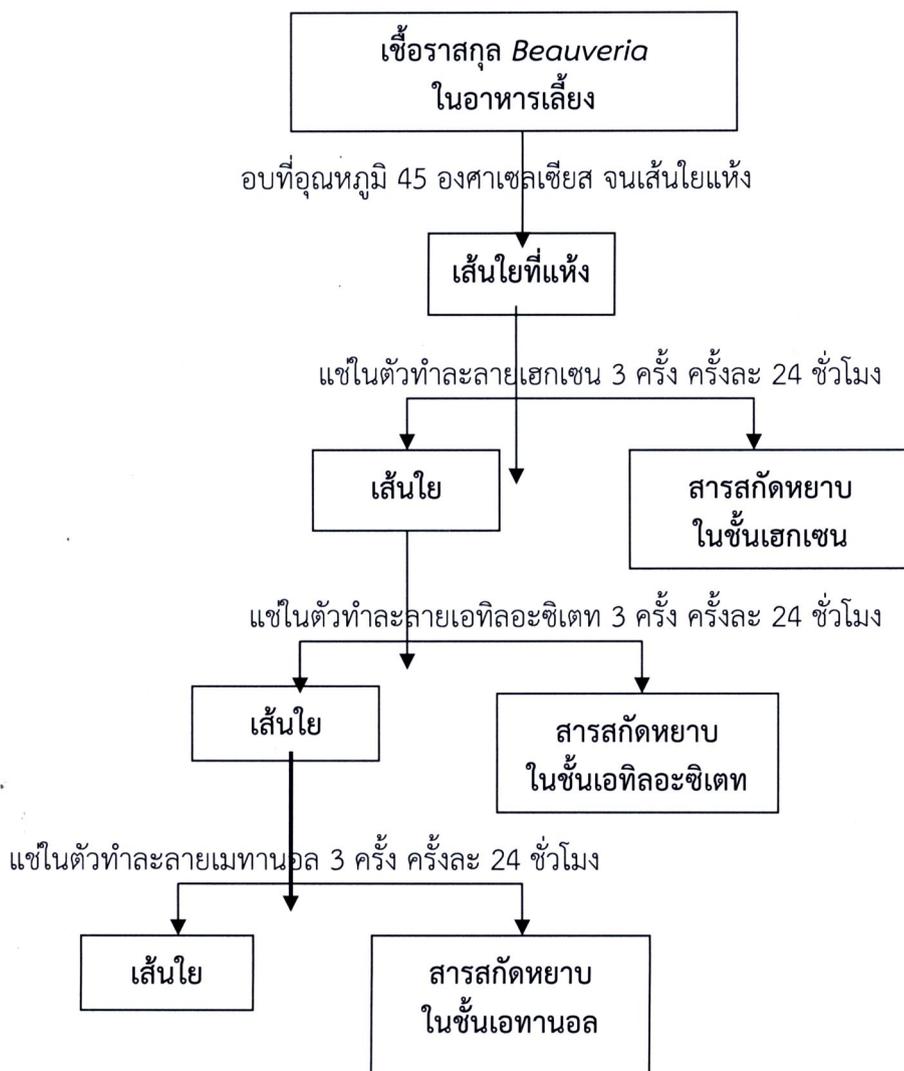
2.2.1 การคัดเลือกเชื้อราในสกุล *Beauveria* เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต และ *B. brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่เก็บรักษาไว้ เมื่อจะนำมาทำการทดลองจึงนำมาถ่ายเชื้อในอาหารสูตร PDA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวก่อนการลงเชื้อ คัดเลือกเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด 2 อันดับแรกในแต่ละสปีชีส์ ด้วยวิธี Dual-culture agar diffusion โดยศึกษาทั้งชนิดอาหาร และระยะเวลาที่เชื้อสามารถผลิตสารได้ดี และเพื่อใช้เป็นสถานะที่เหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตลงบนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA), Yeast Extract Sucrose (YES), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยใช้ cork

borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตรเจาะตรงส่วนเส้นใย พร้อมนำ ขึ้นวุ้นที่มีเส้นใยไปวางในงานที่เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดการเกิดวงใส (clear zone) รอบขึ้นวุ้น โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS 14.0

2.2.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *B. bassiana* และ *B. brongniartii*

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* แต่ละไอโซเลต จำนวนสปีชีส์ละ 2 ไอโซเลต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เชื้อราเจริญในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10-14 วัน ให้ได้ปริมาณเส้นใยมากเพียงพอ ศึกษาและระบุสปีชีส์พร้อมทั้งต้องไม่มีการปนเปื้อนเชื้อราชนิดอื่นๆ จากนั้นใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์แล้วเผาไฟทิ้งให้เย็น เจาะวุ้นส่วนที่มีเส้นใยแล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟ เขี่ยขึ้นวุ้นที่เจาะได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หรือขวดขนาด 8 ออนซ์ ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาที่เชื้อสามารถผลิตสารได้ดี โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารอย่างน้อย 3 ลิตร จากนั้นนำส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนเส้นใยแห้งโดยมีน้ำหนักคงที่ นำส่วนของเส้นใยที่ได้มาบดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก สกัดด้วยตัวทำละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนเส้นใย 1 กรัมต่อปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร โดยในแต่ละตัวทำละลาย นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วประมาณ 150-200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมารองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บไว้ นำส่วนของเส้นใยไปสกัดซ้ำด้วยสารละลายอีกจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยที่เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดหยาบ (crude) ที่ได้แห้งสนิท จะได้สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน จากนั้นนำเส้นใยไปสกัดในสารละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และนำสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายใส่ในขวดสีชาขนาดเล็กที่แห้งสนิท และอบฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกรน้ำหนัก เก็บในที่เย็น เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป พร้อมนำบางส่วนส่งวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยการชั่งสารสกัดหยาบทั้งจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล 50 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อราสกุล *Beauveria*

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

2.2.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* DMST 4212 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 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปตรวจสอบปริมาณของเชื้อ โดยการนำมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้มีค่าประมาณ 0.5 – 1 ซึ่งจะได้เชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10^8 - 10^9 cfu/ml หรือนำไปเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland 0.05

เพื่อให้มีเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml จากนั้นใช้ไม้พีดสำลีที่นิ่งฆ่าเชื้อจุ่มในเชื้อที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ซับให้แห้งกับข้างหลอดทดลอง นำไปเกลี่ย (swab) บางๆ ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาดต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

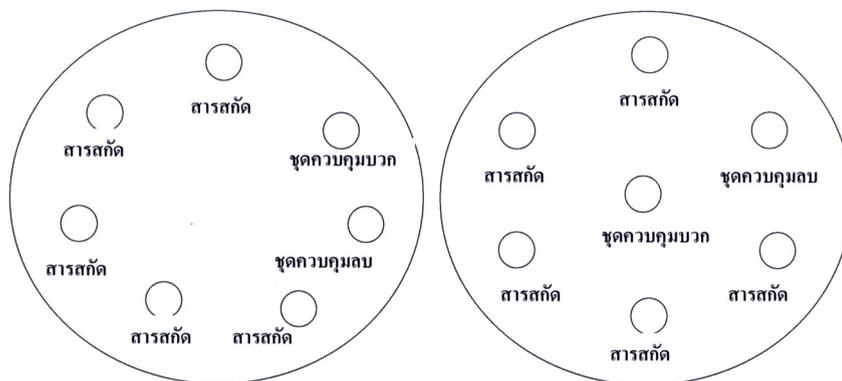
2.2.3.2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาด

นำสารสกัดหยาดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มาละลายด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO โดยชั่งสารสกัดหยาด 100 มิลลิกรัม จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาดที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดหยาดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาดจาก stock มา 200 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอลปริมาตร 4800 ไมโครลิตร สารสกัดหยาดที่ได้จะมีความเข้มข้น 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการทดสอบให้เจือจางสารละลายด้วยเอทานอลในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 4000, 2000, 1000, 500 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำไปทดสอบ

2.2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

เมื่อได้สารละลายเซลล์แขวนลอยที่มีจำนวนเซลล์ที่ต้องการแล้ว นำไม้พีดสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยมาเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารแข็งโดยแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหาร MHA จากนั้นรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการหยดชุดควบคุมทางบวก (Positive control) ซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะชนิด gentamycin ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมทางลบ (negative control) ใช้ตัวทำละลายเอทานอล 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 ตรวจสอบผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของสารสกัดหยาด โดยในการวิเคราะห์ผลการทดลองนั้นจะวิเคราะห์ใน 2 ชั่วโมง นำมาหาค่าเฉลี่ย และในการวิเคราะห์ทางสถิตินำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง กับกลุ่มควบคุม





รูปที่ 2.2 แสดงตำแหน่งการวาง paper disc เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

2.2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

2.2.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว

เลี้ยงเซลล์ชนิดเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29) และเซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร การ subculture นั้นมีวิธีการปฏิบัติดังนี้ นำอาหารเก่าทั้งหมดออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังการนำสารละลาย PBS ออก ใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที ขึ้นกับชนิดของเซลล์ไลน์ เพื่อให้เซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ เมื่อเซลล์ใกล้หลุด นำสารละลายเอนไซม์ทริปซินออก และเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสารละลายเอนไซม์ทริปซิน เคาะขวดเพาะเลี้ยงเซลล์กับฝ่ามือเบาๆ หรือใช้การดูด-ปล่อยเซลล์เบาๆ แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และใส่อาหารให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดขยายต่อไป

2.2.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย

ทำการเลี้ยงเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: P388) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยในการ subculture ทำได้โดยดูดเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 - 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนของอาหารเก่าทิ้ง แล้วเขย่าหลอดทดลองเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่ตกตะกอนกระจายตัว จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ ดูดพ่นให้เข้ากัน จากนั้นดูดเซลล์ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่

37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดขยายต่อไป

2.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

2.2.5.1 การปลูกเซลล์ใน 96 - wells plate

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีการจาก Mosmarin (1983) และ Hussain และคณะ (1993) ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29) และเซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell) ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารดั่งที่กล่าวมาแล้ว ในเซลล์ชนิดเกาะพื้นผิวทำการ trypsinization ด้วยทริปซินที่ความเข้มข้น 0.25% และสำหรับเซลล์ชนิด P388 เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มีซีรัม 10% นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 - 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมหาอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีทรูปแพนบลู จากนั้นปลูกเซลล์ โดยเซลล์ P388 เริ่มต้นจำนวน 0.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร MCF-7 เริ่มต้นจำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ HT-29 และ Vero cell เริ่มต้นจำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร ($0.8 - 1.5 \times 10^4$ เซลล์ต่อหลุม) ลงใน 96-wells plate หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.5.2 การเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มาละลายด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO โดยซึ่งสารสกัดขยาย 100 มิลลิกรัม จากนั้นใส่ DMSO 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 4000 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดขยายจาก stock มา 200 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4800 ไมโครลิตร และทำการกรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 4000, 2000, 1000, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 - wells plate ครบ 24 ชั่วโมง นำมาลงสารสกัดขยายในระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีหลุมที่ไม่ต้องใส่สารสกัดขยาย เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (negative control) หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารที่มีซีรัม 5 % เพื่อใช้เป็น blank หลุมที่ใส่ DMSO ที่เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5% ที่ระดับความเข้มข้น 2% เพื่อใช้ในการตรวจสอบว่าผลการทดลองเป็นผลมาจาก DMSO หรือไม่ และหลุมที่ใส่ Beauvericin (Sigma) ที่ละลายใน methanol และเจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5 % เพื่อใช้เป็น positive control จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.5.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดขยายเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง นำ 96 - wells plate มาใส่สารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นหุ้ม 96 - wells plate ด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อป้องกันแสง นำไปบ่มต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารที่มีสารละลาย MTT โดยใช้เครื่องดูดสาร หรือการคว่ำลงเบาๆบนกระดาษซับ จากนั้นละลายผลึกฟออร์มาซานโดยเติมสารละลาย DMSO: ethanol 95% ปริมาตร 1: 1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ วาดกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด และความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ในแกน y และ x ตามลำดับ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่าการการมีชีวิตของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (50% cytotoxicity: CC_{50})

2.2.6 การตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด Apoptosis

ตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด Apoptosis ด้วยวิธี annexin V/propidium iodide โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry ด้วยการเพิ่มจำนวนเซลล์ P388 โดยการเลี้ยงเซลล์จำนวน $0.8-1 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม Fetal Bovine Serum เข้มข้น 10 % ใน 24 well plate บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อครบเวลา แล้วเติมสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พร้อม positive control ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ โดยการดูดเซลล์ และอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ PBS buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง พร้อมเตรียม 1X annexin-binding buffer เช่นต้องการเตรียม 1X buffer 1 มิลลิลิตร ให้ดูด 5X annexin-binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร (เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส) และเตรียม PI working solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยการดูด PI stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน 1X annexin-binding buffer ที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 45 ไมโครลิตร เติมน้ำ 1X annexin-binding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ และเติม annexin V conjugate ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ PI working solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งและเติมน้ำ 1X annexin-binding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต ด้วยเครื่อง Fluorescence Flow Cytometry หรือ Fluorescence activated cell sorter (FACS) รายงานผลเป็นร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตายในระยะต่างๆ จากจำนวนเซลล์ 10,000 เซลล์ต่อตัวอย่าง

2.2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

2.2.7.1 การเตรียมเลือด

ใช้ Heparin เคลือบกระบอกฉีดยาและเข็มเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นเปลี่ยนเข็มสำหรับเจาะเลือดเพื่อป้องกันไม่ให้ heparin เข้าสู่เส้นเลือด เจาะเส้นเลือดดำ

บริเวณท้องแขนของบุคคลตัวอย่างที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงโดยเพศชาย 1 คนและเพศหญิง 1 คน ใช้เลือดประมาณ 5-10 มิลลิลิตรต่อคน

2.2.7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ผสมกับ 10% Fetal bovine serum ในขวดปลอดเชื้อ หยอดเลือดประมาณ 8-10 หยด และ phytohemagglutinin-M: PHA ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดขวดและนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดสารสกัดหยาบที่ต้องการศึกษาในกลุ่มทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ mitomycin C ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นกลุ่ม negative และ positive control ตามลำดับ ก่อนครบชั่วโมงที่ 72 ประมาณ 50 นาที หยดสารละลาย colcemid ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เพื่อหยุดการแบ่งเซลล์ นำไปเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 72 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ และในทุกขั้นตอนต้องปลอดเชื้อ

2.2.7.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์

หลังจากเลี้ยงเซลล์ครบ 72 ชั่วโมง นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเทใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นดูส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง นำไปผสมให้เข้ากันเบาๆ บนเครื่องผสมสาร (vortex) เพื่อให้เซลล์กระจาย ใส่สารละลายโบแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง ตามด้วยการคงสภาพเซลล์โดยดูส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และค่อยๆ ใส่น้ำยาคงสภาพที่ละหยด จนครบปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ทำซ้ำกัน 3-4 รอบจนได้ตะกอนขาวของเม็ดเลือดขาว

2.2.7.4 การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

ก่อนการหยุดเซลล์บนสไลด์ให้ปรับความเข้มข้นของเซลล์ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และปรับความเข้มข้นด้วยน้ำยาคงสภาพให้เซลล์มีความชุ่มพอสมควร หยุดเซลล์ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นแล้วลงบนสไลด์สะอาดที่ขัดด้วยน้ำยาคงสภาพ 1-2 หยด แล้วหยุดตามด้วยน้ำยาคงสภาพที่เย็น 1 หยด ปล่อยให้สไลด์แห้ง ย้อมสีเซลล์ด้วยสารละลายสี Giemsa ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ใน Phosphate wise buffer เป็นเวลา 5-7 นาที ตามด้วยการล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แห้ง นำไปศึกษาทั้งจำนวนเมทาเฟส และการแตกหักของโครโมโซม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.7.5 การศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์

ในการตรวฉับโครโมโซมจะนับเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสเท่านั้น เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่ออัตราการแบ่งเซลล์จะศึกษาจากค่า Mitotic index เพื่อประเมินผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยนำสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแบบสุ่ม โดยการนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส จากจำนวนเซลล์ทั้งหมด 2000 เซลล์ แล้วนำมาคำนวณหาค่า mitotic index จากสูตร

$$\text{Mitotic index} = [A / B] \times 100$$

เมื่อ A = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในหน่วยทดลอง

B = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในหน่วยควบคุม

2.2.7.6 การวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม

การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมศึกษาจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสที่โครโมโซมกระจายดี โดยในเซลล์นั้นต้องมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 45 และไม่เกิน 47 โครโมโซมและนับจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ จัดบันทึกชนิดของความผิดปกติ และนับจำนวนที่เกิดความผิดปกติตามชนิดของความผิดปกติชนิดนี้

- Single Chromatic gap (SG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนของโครมาทิดแห่งใดแห่งหนึ่ง แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

- Isochromatid gap (ISCG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนโครมาทิดทั้งสองแห่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCG

- Single chromatid break (SB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดแห่งหนึ่งเกิดการหักหรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักอาจอยู่หรือไม่อยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SB

- Isochromatid break (ISCB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดทั้งสองแห่งหักออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักอาจอยู่หรือไม่อยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับจำนวนหักเป็น 2 หักต่อ 1 ISCB

ในการคำนวณค่าเฉลี่ย จำนวนหักของโครโมโซม จะนับจำนวนหักทั้งหมด คำนวณหาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา นำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองแต่ละระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายแต่ละตัว กับกลุ่มควบคุม