

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Sigma
Acrylamide	Merck
Ammoniumpersulfate	Fluka
Acetic acid	J.T. Baker
Absolute ethanol	BDH
Barium chloride	Merck
Blue dextran	Amersham Bioscience
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Brilliant blue R	Sigma
Bromophenol blue	Fluka
Carbazole	Fluka
Chondroitin sulfate A	Sigma
Chondroitin sulfate C	Sigma
DeadEnd colorimetric TENEL System	Promega
Dextran sulfate	Sigma
1,3 diaminopropane	Fluka
Di-sodiumhydrogenphosphate 7-hydrate	Merck

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Dithiothreitol (DTT)	USB
Dulbecco 's Modified Eagle Medium	Gibco
Ethanol	BDH
Fetal calf serum	BIOCHROM AG
Folmaldehyde	Merck
Fuchsin	Fluka
Gelatin	Sigma
Glycerol	Fisher
Glycine	BDH
Heparin	Leo
HEPES	Sigma
Hexadecyltrimethylammonium bromide	Sigma
Hydrochloric acid	Merck
L-Cysteine	Sigma
L-fucose	Sigma
MTT	Sigma
N,N '-methylene-bis-acrylamide	Merck
Nutrient agar	DifCo
Periodic acid	Sigma
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Permout [®] mounting medium	Fisher
Potassiumdichromate	Carlo Erba
Potassium chloride	Fluka

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Potassium dihydrogenphosphate	Merck
Potassium sulfate	Merck
Sephadex G-50	Phamacia
Sodium acetate	Merck
Sodium bicarbonate	BDH
Sodium chloride	Lab Scan
Sodium disulfite	Reidel-de Haen [®]
Sodium hydroxide	Carlo Erba
Sodium Lauryl sulfate	Aps Ajax Finechem
Sucrose	Carlo Erbe
Sulfuric acid	Lab Scan
Thrombin	Sigma
Trichloroacetic acid	Carlo Erba
Tris base	Promega
Tri-sodium citrate	APS
Triton X-100	USB
Trypsin-EDTA	Gibco
Tryptone	Pronadisa
Xylene	J.T. Baker
Yeast extract	USB

2.1.2 ตัวอย่างพืชที่ใช้ทดลอง

สำหรับข้าวเหนียวจากแหล่งน้ำจืด บริเวณคลองพระวง หมู่ที่ 6 ต.น้ำน้อย อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

2.1.3 เซลล์สัตว์ทดลอง

KB cell (ATCC CCL 17) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง Keratinocyte บริเวณ Nasopharynx และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ที่แยกจากเซลล์ผิวหนัง ได้รับอนุเคราะห์จาก รศ.ทพญ.ดร.อุรีพร เล็กกัต ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์

2.2 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทที่ผลิต
1. เครื่องกวนผสม	Jenway
2. เครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน (fraction collector)	Bio-Rad
3. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น 1000/500	Bio-Rad
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น 2200 C SCS	Precisa
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204	Mettler Toledo
6. เครื่องทำแห้งควบคุมอุณหภูมิ (freeze dry)	Labconco
7. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า	Labline
8. เครื่องแยกคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี agarose gel electrophoresis	Bio-Rad
9. เครื่องแยกโปรตีนโดยวิธี acrylamide gel electrophoresis	Bio-Rad
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตรุ่น Ultrospec III	Pharmacia
11. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000	Eutech Cybernetics
12. เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น Biofuge	Sorvall
13. เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น Z 230 A	Hermle
14. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น MRX-150	Tomy
15. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น RC 58	Sorvall
16. ตู้แช่แข็ง - 20 °C	Sanyo
17. ตู้แช่แข็ง - 70 °C	Sanyo
18. ตู้ดูดควัน	Major

อุปกรณ์	บริษัทที่ผลิต
19. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ	Mettler
20. ตู้ปราศจากเชื้อ (laminar flow)	Biohazard
21. ตู้ปราศจากเชื้อ (microflow advanced bio safety)	Astec
22. ปั๊มควบคุมอัตราการไหล (peristaltic pump) รุ่น MP-3	Eyela
23. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)	Hirayama
24. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Mettler
25. microtiter plate reader	Titertek [®] Multiskan

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การสกัดสารฟุคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียว

2.3.1.1 วิธีการสกัดสารฟุคอยแดน (Doner and Whistler, 1973)

สาหร่ายข้าวเหนียว ที่ผ่านการล้างทำความสะอาด ตากให้แห้ง และบดเป็นผง น้ำหนัก 100 g นำมาแยกส่วนที่ปนเปื้อนออกโดยต้มในน้ำกลั่น อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง กรองส่วนใสทิ้ง นำส่วนกากสาหร่ายมาสกัดด้วย 0.1 M Hydrochloric acid (HCl) ปริมาตร 1,000 ml ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองและนำส่วนสารละลายที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization นำส่วนกากสาหร่ายที่เหลือมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ซึ่งห่าน้ำหนักของสาร

2.3.1.2 การหาความเข้มข้นของฟุคอยแดน (Whistler, 1971)

นำสารสกัดหยาบฟุคอยแดน ที่สกัดได้จากข้อ 2.3.1.1 มาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/ml นำมาหาความเข้มข้นของฟุคอยแดน โดยวิธี cystein-sulfuric acid (Whistler, 1971) โดยเติม H₂SO₄ - H₂O ที่เย็น อัตราส่วน 6 : 1 (v/v) ปริมาตร 4.5 ml ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 นาที นำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีหลังจากครบเวลา จากนั้นเติม 3 % cysteine hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 ml วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360 nm และ 427 nm โดยใช้ L-fucose ความเข้มข้น 10-50 µg/ml เป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาความเข้มข้นของ fucose โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ L-fucose (µg/ml) กับผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 396 และ 427 nm (ภาคผนวก ข) แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของฟุคอยแดน ตามความสัมพันธ์ ดังนี้ (Doner and Whisler, 1993)

$$\text{fucoidan } (\mu\text{g/ml}) = 1.75 \times \text{fucose } (\mu\text{g/ml})$$

2.3.2 การทำบริสุทธิ์สารฟุคอยแดน โดยวิธี gel filtration chromatography (Zierer *et al.*, 2000)

นำสารสกัดหยาบฟุคอยแดน จากข้อ 2.3.1.1 ที่มีปริมาณฟุคอยแดน 100 mg ละลายใน 50 mM sodium acetate ปริมาตร 1 ml มาทำบริสุทธิ์ ด้วย sephadex G-50 column (1 x 60 cm) โดยชะด้วย 0.5 M sodium chloride (NaCl) ใน 50 mM sodium acetate ด้วยอัตราการไหล 5 ml/hr เก็บสารละลายหลอดละ 2 ml นำสารละลายที่ได้ในแต่ละหลอดมาหาความเข้มข้นของ fucose รวมทั้งปริมาณ glucuronic acid และคุณสมบัติในการย้อมติดสี dimethylmethylene blue จากนั้นนำสารละลายฟุคอยแดนที่แยกได้มากำจัดเกลือออกโดยวิธี dialysis ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้เมมเบรนที่มีขนาดตัดโมเลกุลที่ 2000 Da (MW cut-off 2000) ทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization

2.3.3 การศึกษาองค์ประกอบของสารฟุคอยแดน

2.3.3.1 การหาปริมาณ glucuronic acid โดยวิธี carbazole reaction (Dische, 1947)

นำสารสกัดหยาบฟุคอยแดนและสารฟุคอยแดนที่บริสุทธิ์ จากข้อ 2.3.2 ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มาทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 6 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 1% carbazole ที่ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 0.2 ml วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm โดยใช้ glucuronic acid ความเข้มข้น 10-50 $\mu\text{g/ml}$ เป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ glucuronic acid เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

2.3.3.2 การศึกษาคุณสมบัติในการย้อมติดสี dimethyl methylene blue (metachromatic property) (Farndale *et al.*, 1986)

นำสารละลายฟูกอยแดนที่แยกผ่านคอลัมน์ sephadex G-50 จากข้อ 2.3.2 ปริมาตร 0.1 ml ทำปฏิกิริยากับ 1,9 dimethylmethylene blue reagent, pH3 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2.5 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 nm

2.3.3.3 การหาปริมาณ sulfate โดยวิธี Barium chloride - gelatin (Dodgson, 1961)

สารสกัดหยาบฟูกอยแดนและสารฟูกอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 0.2 ml มาหาปริมาณ sulfate โดยเติม 4% Trichloroacetic acid (TCA) 3.8 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ BaCl₂ - gelatin reagent 1 ml (ภาคผนวก ก) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360 nm โดยเตรียมสารละลาย potassium sulfate (K₂SO₄) ให้มีปริมาณ SO₄²⁻ อยู่ระหว่าง 20-200 µg เป็นสารมาตรฐาน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ SO₄²⁻ (µg) กับค่าการดูดกลืนแสง (OD 360 nm) ในภาคผนวก ข

2.3.3.4 การหาปริมาณโปรตีนที่ปนเปื้อนในสารฟูกอยแดน

นำสารสกัดหยาบฟูกอยแดนและสารฟูกอยแดนกึ่งบริสุทธิ์จำนวน 0.01 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 µg/ml มาหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (1951) โดยใช้สารละลายปริมาตร 1 ml ทำปฏิกิริยากับ reagent A ปริมาตร 1 ml ที่ประกอบด้วยสารละลาย copper tartate carbonate (ภาคผนวก ก), 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) และ 0.8 M sodium hydroxide อัตราส่วน 1:2:1 ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม reagent B ปริมาตร 0.5 ml ซึ่งประกอบด้วย 0.4 N Folin Ciocalteu phenol reagent ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

750 nm เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้กับกราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ข)

2.3.4 การแยกคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

ละลายสารสกัดหยาบฟูกอยแดนและสารฟูกอยแดนกิ่งบริสุทธิ์ ที่มีปริมาณฟูกอยแดน 10 mg รวมทั้งสารมาตรฐาน Dextran sulfate ขนาดโมเลกุล 8,000 Da, Chondroitin sulfate A ขนาด 15,000 Da และ Chondroitin sulfate C ขนาด 60,000 Da จำนวน 10 mg ละลายใน 0.05 M 1,3 diaminopropane/acetate buffer, pH 9.0 ปริมาตร 0.4 ml นำสารละลายตัวอย่าง 15 μ l และสารละลายมาตรฐาน 5 μ l ผสมรวมกับ loading dye (0.25 % bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol และ 40% (w/v) sucrose ในน้ำกลั่น) ปริมาตร 1 μ l นำมาแยกบน 1 % agarose gel ใน 1,3 diaminopropane/acetate buffer (pH 9.0) โดยให้ความต่างศักย์คงที่เท่ากับ 70 volt เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง นำเจลมาแช่ใน 0.1% hexadecyltrimethylammonium bromide 20 นาที แล้วแช่ใน 1% periodic acid 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที นำมาย้อมด้วยสี PAS (Periodic acid leucofuchsin) (ภาคผนวก ก) จนเห็นแถบสีชมพูบนเจล แล้วล้างด้วย 0.52 % sodium disulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) จนเห็นแถบสีชมพูชัดเจน

2.3.5 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารฟูกอยแดน โดยวิธี gel filtration chromatography

นำสารสกัดหยาบฟูกอยแดนและสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของฟูกอยแดน 10 mg/ml มาแยกโดยใช้คอลัมน์ sephadex G-200 ขนาด 1 x 100 cm ทำการชะด้วย 0.5 mM NaCl ใน 50 mM sodium acetate ด้วยอัตราการไหล 5 ml/hr เก็บสารละลายหลอดละ 2 ml จากนั้นคำนวณหาปริมาตรชะของสารแล้วนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของ Dextran sulfate ขนาดโมเลกุล 8,000 Da, Chondroitin sulfate A ขนาด 15,000 Da และ Chondroitin sulfate C ขนาด 60,000 Da

2.3.6 การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

2.3.6.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และ *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*) จาก stock ที่เก็บที่อุณหภูมิ -80°C มาทำให้ละลาย แล้ว streak บนอาหาร Nutrient agar 2.5 % สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และ Nutrient agar ที่มี 1.5 % NaCl สำหรับเชื้อ *V. harveyi* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร Nutrient agar มาเลี้ยงในอาหาร LB broth (1% tryptone, 0.5 % yeast extract และ 0.5 % NaCl) สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และ LB broth ที่มี 1.5 % NaCl สำหรับเชื้อ *V. harveyi* บ่มในเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 37°C จนได้จำนวนเซลล์ 1.5×10^9 เซลล์ (OD 640 nm เท่ากับ 0.267) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3.6.2 การทดสอบผลของสารฟุคอยแดนต่อการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี agar plate sensitivity method (Cappuccino, 1986)

นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *V. harveyi* ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1.5×10^9 เซลล์ (OD 640 nm = 0.267) จากข้อ 2.3.6.1 มาทดสอบผลของสารฟุคอยแดน โดยใช้สำลีพันปลายไม้ชุบเชื้อแบคทีเรียจนชุ่มนำมาเกลี่ย (spread) บนอาหาร Nutrient agar สำหรับเลี้ยง *E. coli* และ *S. aureus* และ Nutrient agar ที่มี 1.5 % NaCl สำหรับเลี้ยง *V. harveyi* ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที ใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อคีบแผ่นดิสก์แต่ละในสารละลายของสารสกัดหยาบฟุคอยแดนที่ระดับความเข้มข้น 90, 45, 22.5, 11.25 และ 5.62 mg/ml แล้วนำแผ่นดิสก์วางลงบนอาหารที่ปลูกเชื้อไว้ โดยใช้ 0.85 % NaCl เป็นตัวควบคุม นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยดูบริเวณวงใสรอบแผ่นดิสก์ (clear zone) ที่มีสารฟุคอยแดนความเข้มข้นต่างๆ

2.3.6.3 การหาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) และค่า MBC (minimum bactericidal concentration) ของสารฟุคอยแดนต่อการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาค่า MIC ใช้สารละลายฟุคอยแดนความเข้มข้นเริ่มต้น 40 mg/ml ปริมาตร 1 ml ทำการเจือจางสารแบบเป็นลำดับ (serial dilution) 1:2 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.62 mg/ml ด้วยอาหาร LB broth สำหรับเชื้อ *E. coli* และอาหาร LB broth ที่มี 1.5 % NaCl สำหรับเชื้อ *V. harveyi* ให้ได้ปริมาตรหลอดละ 1 ml โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารฟุคอยแดนเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นดูเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยใช้จำนวนเชื้อ 1.5×10^9 เซลล์ (OD 640 nm เท่ากับ 0.267) มาเจือจาง 200 เท่าด้วย 0.85 % NaCl เติมลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นและอ่านค่า MIC (Lennette *et al.*, 1974) นำสารละลายในหลอดที่มีความใส เทลี่ยบนอาหาร Nutrient agar สำหรับเชื้อ *E. coli* และอาหาร Nutrient agar ที่มี 1.5 % NaCl สำหรับเชื้อ *V. harveyi* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อหาค่า MBC

2.3.7 การศึกษาคุณสมบัติในการต้านการแข็งตัวของเลือด

ทดสอบคุณสมบัติของสารฟุคอยแดนต่อการต้านการแข็งตัวของเลือดจากค่า Activated partial thromboplastin time (APTT) โดยใช้พลาสมาจากเลือดคนปกติ ซึ่งเตรียมโดยนำเลือดที่ได้มาผสมกับ 3.8% sodium citrate นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำพลาสมา ปริมาตร 200 μ l มาทดสอบกับสารละลายฟุคอยแดนที่ความเข้มข้น 100, 200, 250 และ 300 μ g/ml ปริมาตร 50 μ l วัดระยะเวลาการแข็งตัวของเลือด (clotting time) หลังจากเติม thrombin 0.25 NIH unit (National Institute of Health Unit) ปริมาตร 200 μ l คำนวณค่าการแข็งตัวของเลือดโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Heparin

2.3.8 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

2.3.8.1 การเตรียมเซลล์เริ่มต้น

นำ KB cell (ATCC CCL 17) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง Keratinocyte บริเวณ Nasopharynx และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ที่ได้จากเซลล์ผิวหนัง จาก stock ที่เก็บในไนโตรเจนเหลว มาทำให้ละลายทันทีที่ 37 °C นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 rpm, 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเพื่อกำจัด Dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่อยู่ในอาหารเดิมออก นำเซลล์ที่ได้เลี้ยงในอาหาร Dulbecco 's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% Fetal calf serum และ 2% penicillin-streptomycin (penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml และ amphotericin B 25 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37 °C , 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) จนได้เซลล์เต็มขวดเลี้ยงเซลล์ ย่อยเซลล์ให้หลุดจากขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) โดยใช้ 0.05% Trypsin-EDTA 2 ml นำไปบ่มที่ 37 °C 4 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมอาหารลงไป 2 ml นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 rpm 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป นำเซลล์ที่ได้เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยเลี้ยงเซลล์ต่อไปประมาณ 3-4 passage จึงจะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3.8.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารฟุคอยแดนต่อเซลล์

มะเร็ง KB cell และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยวิธี MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) assay (Freshney, 1994)

นำเซลล์มะเร็งและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.8.1 : เลี้ยงในภาตหตุลุม 96 หลุม จำนวน 1,500 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารออก แล้วเติมสารละลายของสารสกัดหยาบฟุคอยแดน และสารฟุคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.81 และ 3.9 µg/ml ในอาหาร DMEM โดยชุดควบคุมให้เป็นอาหารปกติ นำไปบ่มที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดูดอาหารที่มีสารละลายฟุคอยแดนออก แล้วเติม MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 50 µl นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูด MTT ออก แล้วเติม DMSO 200 µl และ 0.1 M

glycine ที่มี 0.1M NaCl ปริมาตร 50 μ l นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้ Microtiter plate reader (Titertek[®] Multiskan) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของสี MTT ในหลุมของเซลล์มะเร็งและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ได้รับสารฟุคอยแดนเป็น 100 %

2.3.8.3 การศึกษากระบวนการ Apoptosis ต่อเซลล์มะเร็ง โดยวิธี

TUNEL assay (TdT - mediated dUTP Nick-End Labeling assay)

เลี้ยงเซลล์มะเร็งจำนวน 2×10^6 cell/ml ในขวดเลี้ยงเซลล์ โดยให้สารฟุคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ความเข้มข้น 250 μ g/ml และเซลล์มะเร็งที่ให้อาหารปกติเป็นตัวควบคุม นำไปบ่มที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย่อยเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีในข้อ 2.3.8.1 แล้วล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄ และ 8.1 mM Na₂HPO₄ , pH 7.4) 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาตรึงบนสไลด์ที่เคลือบด้วย poly - L-lysine ใน 10 % formaldehyde (เจือจางใน PBS) 25 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างสไลด์ด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำสไลด์แช่ใน 0.2 % Triton X-100 (ในสารละลาย PBS) 10 นาที แล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเซลล์ที่ตรึงบนสไลด์มาทำ TUNEL assay โดยใช้ DeadEnd[™] Colorometric TUNEL System (Promega, USA) โดยเติม equilibration buffer 100 μ l (200 mM potassium cacodylate pH 6.6, 25 mM Tris-HCl, 0.2 mM DTT, 0.25 mg/ml BSA และ 2.5 mM cobalt chloride) 10 นาที นำมาทำปฏิกิริยากับ TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) reaction mix 100 μ l (equilibration buffer 98 μ l, biotinylated nucleotide 1 μ l และ TdT enzyme 1 μ l) ปิดสไลด์ด้วย parafilm แล้วนำไปบ่มบน chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที แช่สไลด์ใน 2X SSC (20X SSC ประกอบด้วย 3M NaCl และ 0.3 M sodium citrate ใน deionized water, pH 7.2) 15 นาที ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำไปแช่ใน 0.3% Hydrogenperoxide (H₂O₂) 10 นาที แล้วล้างด้วย PBS

2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำปฏิกิริยาด้วย Streptavidin HRP (Horseradish-peroxidase-labeled streptavidin) 100 μ l (เจือจาง Streptavidin HRP 1: 500 ด้วย PBS) ปุ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมสารตั้งต้น DAB (diaminobenzidine) solution 100 μ l (50 μ l DAB substrate 20X buffer, 950 deionize water, 50 μ l DAB 20X chromogen และ 50 μ l H_2O_2 20X) เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น นำสไลด์แช่ใน 70% ethanol, 95 % ethanol, absolute ethanol และ xylene ตามลำดับ แล้ว mount สไลด์ด้วย Permount[®] mounting medium (Fisher) ปิดสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์ นับจำนวนเซลล์ที่เกิด apoptosis ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตนิวเคลียสของเซลล์ที่เกิด apoptosis จะย้อมติดสีน้ำตาลเข้ม คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งที่ให้สารฟูคอยแดนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม