การทดลอง : การทดสอบสารสกัดเคเอสเพื่อตรวจสอบความยาว Telomere

วัตถุประสงค์ : เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดเคเอส สามารถเพิ่มความความยาว Telomere

วิธีทดสอบ

1. การเตรียมตัวอย่างโดยชั่งสารสกัดเคเอส 100 มิลลิกรัม เติมน้ำ DI 1 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ Sonicate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วย syringe filter (0.22 μm pore size) และเจือจางโดยอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อนำไปทดสอบ

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela

2.1 ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ใน 6 well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 5×10^5cells/well แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 เติมอาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบที่ความเข้มข้น 0.062 mg/mL และ 0.125 mg/mL จากนั้นทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การสกัด Genomic DNA จากเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ดำเนินการสกัด Genomic DNA ตามขั้นตอนของชุดน้ำยาสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit, vivantis, United State. จากนั้นนำไปวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop

4. ดูการเพิ่มจำนวนของยีนด้วยเทคนิค qRT-PCR

4.1 ดำเนินการเตรียมตัวอย่างทดสอบ 2 การทดสอบในแต่ละตัวอย่าง คือ Telomere primer และ SCR primer ตามชุดตรวจสำเร็จรูป Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit, ScienCell, Thailand โดยจะประกอบไปด้วยส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้

Reference genomic DNA sample	1	μL
Primer stock solution (Telomere or SCR)	2	μL
2X GoldNStart TaqGreen qPCR master mix	10	μL
Nuclease-free H_2O	7	μL
รวมปริมาตรสุทธิ	20.0	μL

Genomic DNA sample (0.5 – 5 ng/µl)	1	µL
Primer stock solution (Telomere or SCR)	2	µL
2X GoldNStart TaqGreen qPCR master mix	10	µL
Nuclease-free H2O	7	µL
รวมปริมาตรสุทธิ	20.0	µL

4.2 นำตัวอย่างเข้าเครื่อง CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad โดยกำหนดสภาวะของเครื่องดังนี้

Pre-Denatured	95.0˚c	10 min
Denatured	95.0˚c	20 sec
Annealing	52.0˚c	20 sec
Extension	72.0˚c	45 sec
Total cycle	32 cycles	

4.3 การวิเคราะห์ความยาว Telomere ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ที่ไม่ได้รับการรักษา (กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ที่ได้รับการรักษาด้วยสารตัวอย่าง (กลุ่มตัวอย่าง) จากสูตร - ความยาว Telomere (ตัวอย่าง) ต่อความยาว Telomere (กลุ่มควบคุม) = $2^{-\Delta\Delta Cq}$

- ความยาว Telomere ตัวอย่าง ต่อ เซลล์แบบ diploid
  = ความยาว Telomere กลุ่มควบคุม (1.23 ± 0.09 Mb) x $2^{-\Delta\Delta Cq}$

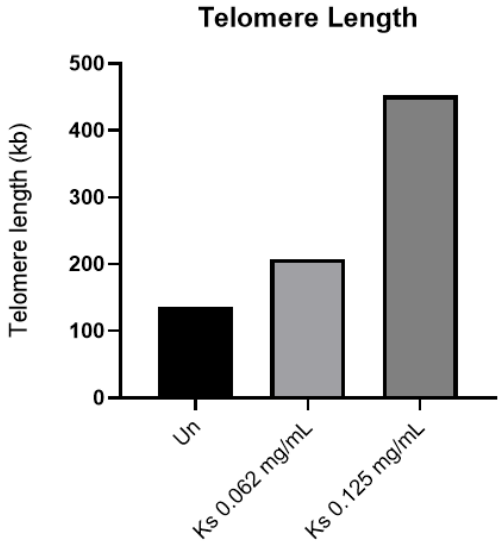
*หมายเหตุ การวิเคราะห์ความยาว Telomere ชุดkit Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit, ScienCell, Thailand

ผลการทดสอบ

ผลการวิเคราะห์ความยาว Telomere โดยเทคนิค qRT-PCR โดยการเปรียบเทียบความยาว Telomere ในกลุ่มตัวอย่างกับกลุ่มควบคุม พบว่า ความยาว Telomere ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดเคเอส ที่ความเข้มข้น 0.062 mg/mL และ 0.125 mg/mL พบว่า สารสกัดเคเอสมีผลทำให้ความยาว Telomere เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ Telomere Length ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่ม	น้ำหนักตัวอย่างทดสอบ (mg)	ความเข้มข้นของสารทดสอบ (mg/mL)	Telomere Length (kb)
Control	-	-	136 ± 12
Ks	1.000	0.062	207 ± 18
Ks	1.000	0.125	452 ± 40



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ Telomere Length (kb) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ที่ไม่ได้รับการทดสอบ (กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดเคเอส ปริมาณ 0.062 mg/mL และ 0.125 mg/mL ตามลำดับ (กลุ่มตัวอย่าง)

สรุปผลการทดสอบ

การวิเคราะห์ Telomere Length (kb) เป็นดัชนีชี้วัดความยาว Telomere ภายในเซลล์ จากผลการทดสอบสรุปได้ว่าสารสกัดเคเอส มีผลทำให้ความยาว Telomere เพิ่มขึ้น ดังนั้นตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Kerra มีฤทธิ์สามารถเพิ่มความยาว Telomere ภายในเซลล์ได้