**การทดลอง:** ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HER2 ของสารสกัดเคอราด้วยเอทานอล (ผลิตภัณฑ์ Kerra) ด้วย ADP-GloTM Kinase assay

| **ชื่อตัวอย่าง**  | : สารสกัด Kerra |
| --- | --- |
| **รูปแบบผลิตภัณฑ์** | :  |
| **ลักษณะทางกายภาพ**  | : ของเหลวสีน้ำตาล |
| **ผู้ทำการทดลอง** | : ณัฐนรี คุ้มศิริ |

**วิธีการทดลอง**

1. เตรียมสารสกัดเคอราด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 125,000 µg/mL และเจือจางความเข้มข้นด้วยตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) อีก 9 ความเข้มข้น ซึ่งจะถูกเจือจางเป็น 2 เท่า โดยใช้ DMSO จนครบ (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาทั้ง 10 ความเข้มข้น ได้แก่ 19.53, 39.06, 78.13, 156.25, 312.5, 625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 µg/mL)

3. เตรียมเอนไซม์ HER2 ที่ความเข้มข้น 50 ng/µL โดยละลายด้วย Kinase buffer (40 mM ของ Tris-HCl pH 7.5, 20 mM ของ MgCl2, 0.1 mg/mL ของ bovine serum albumin)

4. เตรียมสารละลายผสม (Mixture) ที่มีความเข้มข้นของ ATP และ Poly(Glu4, Tyr1) ) เท่ากับ 12.5 µM และ 6.25 µg/mL ตามลำดับโดยถูกละลายด้วย Kinase buffer

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HER2 ด้วย ADP-GloTM Kinase assay เริ่มจากหยอด ตัวอย่างที่ถูกเตรียมปริมาตร 2 µL ลงในหลุมของ 384-well plates สีขาว ตามด้วย Kinase buffer ปริมาตร 8 µL และเติมเอนไซม์ EGFR-TK ปริมาตร 5 µL แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติม Mixture ปริมาตร 10 µL หลังจากบ่มที่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 5 µL ของ ADP-Glo™ Reagent บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคเนสและกำจัด ATP ที่เหลือในปฏิกิริยา สุดท้ายเติม 10 µL ของ Kinase Detection Reagent บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดปริมาตร Luminescence ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องSynergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek, UK).

6. ตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบนั้นมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาคล้ายกับข้อ 5 แต่ควบคุมเชิงบวกและส่วนตัวควบคุมเชิงลบ จะหยอด DMSO ปริมาตร 2 µL แทนตัวอย่าง ส่วนตัวควบคุมเชิงลบนั้น จะหยอด 1X Kinase buffer ปริมาตร 2 µL แทนเอนไซม์ HER2

7. คำนวณ % relative inhibition

สมการ % relative inhibition

%𝑟𝑒𝑙𝑎𝑡𝑖𝑣𝑒 𝑖𝑛ℎ𝑖𝑏𝑖𝑡𝑖𝑜𝑛 = {[(positive−negative) − ( sample−negative)] /(positive−negative)} ×100%

8. สร้างกราฟ IC50 ด้วยโปรแกรม GraphPadPrism 8

**ผลการทดลอง**

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HER2 ของสารสกัดเคอราด้วยเอทานอล ด้วยชุดการทดสอบADP-GloTM Kinase assayที่ตรวจวัดกิจกรรมการเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอรีเลชั่นของเอนไซม์ HER2 พบว่า สารสกัดเคอราด้วยเอทานอล มีค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HER2 ได้ครึ่งหนึ่ง ( IC50 ) เท่ากับ 456.30 ± 31.89 µg/mL แสดงข้อมูลดังภาพที่1

**ภาพที่ 1** ผลการทดสอบความสามารถการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HER2ของสารสกัดเคอราด้วยเอทานอล ด้วย ADP-GloTM Kinase assay โดยในปฏิกิริยามี  10 ng/µL HER2 และสารสกัดเคอราด้วยเอทานอล 10 ความเข้มข้น (19.53, 39.06, 78.13, 156.25, 312.5, 625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 µg/mL) และทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซึ่งข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SD จากโปรแกรม GraphPadPrism 8

**สรุปผลการทดลอง**

สารสกัดเคอราด้วยเอทานอล มีสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HER2 เนื่องจากมีค่า IC50 เท่ากับ 456.30 ± 31.89 µg/mL