รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ของ Kerra และ KS ในการ

เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ Autophagy ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549

ตัวอย่างสาร: 1. Kerra (EtOH), 2. KS, 3. Rapamycin

รายละเอียดของตัวอย่าง: ผงละเอียด

วันที่ทดสอบตัวอย่าง: 19 มิถุนายน 2566

วิธีทดสอบ: Muse Autophagy LC3-Antibody based kit (Muse Cell Analyzer)

1. การเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ Autophagy

<u>ขั้นตอน</u>

1. ทำการเลี้ยงเซลล์ A549 ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 2.5×10^4 cells/well แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เติมอาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบตามความเข้มข้น (IC50) ที่ต้องการใช้โดยอาหารเลี้ยงเซลล์มีส่วนประกอบของ FBS เท่ากับ 1% แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ทำการ dilute Reagent A กับอาหารเลี้ยงเซลล์ 1:50 แล้วเติม 10 µL. ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่ม 30 นาที ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C

4. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทั้งหมดแล้วทำการล้างด้วย PBS 1-2 ครั้ง

5. เติม Trypsin 50 µL. ในแต่ละหลุมแล้วบ่ม 3-5 นาทีในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C

6. ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์รอไว้ในหลอด 1.5 mL. หรือใน 96 well plate ปริมาตร 100 µL.

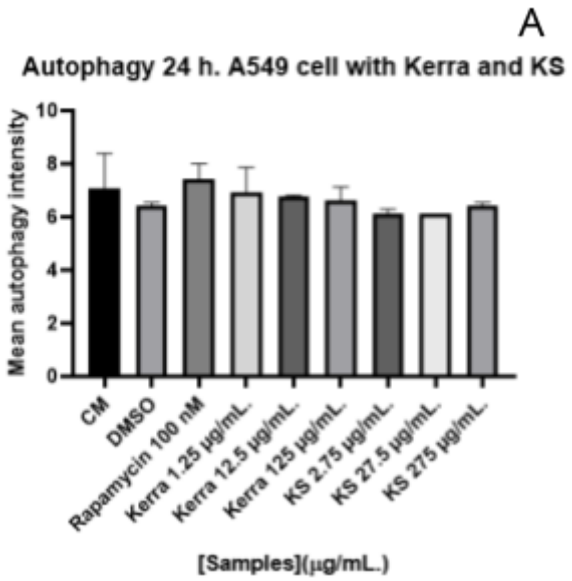
7. เมื่อครบเวลา Resuspend เบา ๆ แล้วดูดใส่ในหลอด 1.5 mL. หรือใน 96 well plate

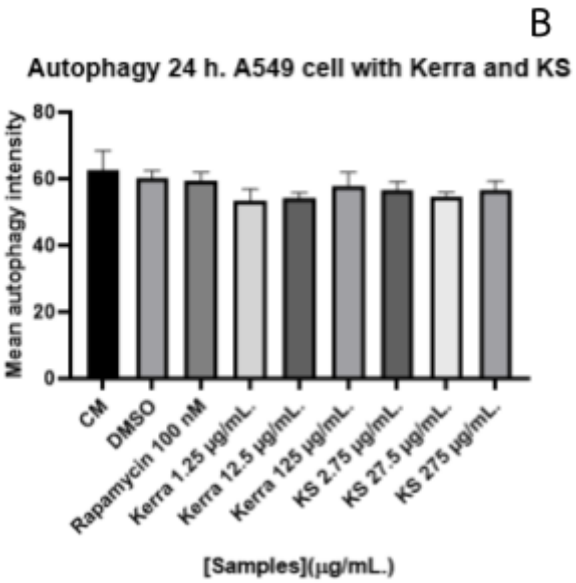
8. นำมาปั่นตกที่ 300 g. x 5 นาที ที่ 4 ˚C แล้วทิ้งส่วนใส

9. ทำการเตรียมตัวอย่างตาม Protocol ของชุด Muse Autophagy LC3-Antibody based kit

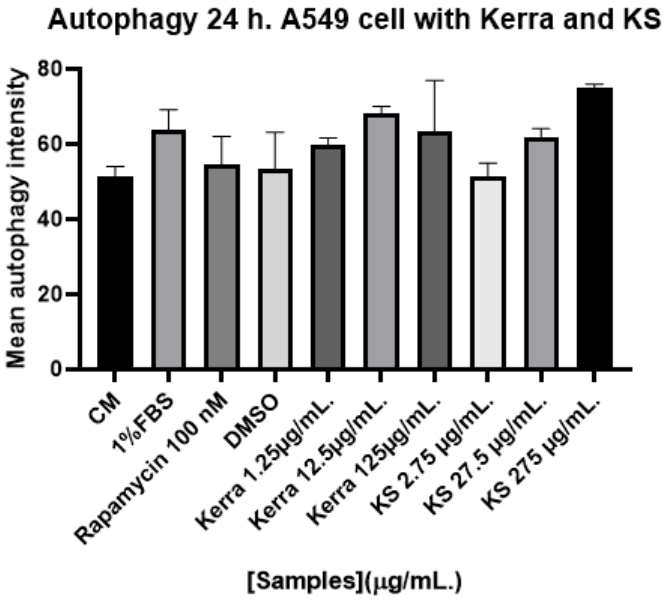
ผลการทดสอบ

1. การเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ Autophagy





ในการทดสอบครั้งที่ 1 (A) และ 2 (B) เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบ 10% FBS พบว่าทั้ง 2 ครั้งผลในการเหนี่ยวนำ Autophagy โดยใช้สารทดสอบ Kerra (EtOH) และ KS **ไม่เกิดความแตกต่างกับเซลล์ในภาวะปกติ**ดังกราฟจึงทำการนำมาทดสอบอีกครั้ง



ในการทดสอบครั้งที่ 3 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบ 1% FBS พบว่าผลในการเหนี่ยวนำ Autophagy โดยใช้สารทดสอบ Kerra (EtOH) และ KS **เกิดความแตกต่างกับเซลล์ในภาวะปกติเล็กน้อย**ดังกราฟ โดยพบว่าสารทดสอบ KS มีแนวโน้มในการเหนี่ยวนำ Autophagy ได้ดีกว่า Kerra (EtOH) โดยจะพบว่าเมื่อ KS มีความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้ความหนาแน่นของ Autophagy เพิ่มขึ้นด้วย

สรุปผลการทดสอบ: ในการทดสอบ**ครั้งที่ 1** เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบ 10% FBS แล้วทำการบ่มกับสารทดสอบ Kerra (EtOH) และ KS พบว่าไม่มีความแตกต่างของความหนาแน่น Autophagy จึงได้มีการทำการทดสอบครั้งที่ 2 เพื่อทำการยืนยันพบว่า ใน**ครั้งที่ 2** ไม่มีความแตกต่างของความหนาแน่น Autophagy เช่นกัน จึงได้มีการทดสอบครั้งที่ 3 โดยที่ในการทดสอบ**ครั้งที่ 3** ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบ 1% FBS แล้วทำการบ่มกับสารทดสอบ Kerra (EtOH) และ KS พบว่าเกิดความแตกต่างกับเซลล์ในสภาวะปกติ โดยพบว่า KS มีแนวโน้มในการเหนี่ยวนำ Autophagy ได้ดีกว่า Kerra (EtOH) ทั้งนี้การทดสอบนี้เป็นเพียงการทดสอบในระดับเซลล์เท่านั้น