

การทดสอบกิจกรรมของ ATP ในเซลล์ตับ (HepG2)

ตัวอย่างสาร: KS

รายละเอียดของตัวอย่าง: ผง

วิธีทดสอบ: ADP-Glo™ Kinase Assay

วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างการศึกษากิจกรรมของ ATP ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่ทดสอบด้วยผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ด้วยวิธี ADP-Glo™ Kinase Assay

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ใน 6 well ให้มีความหนาแน่นร้อยละ 80-90
2. เลือกความเข้มข้นของสารทดสอบที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด นำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง ตับ (HepG2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ระวังไม่ให้โดนพื้นที่ด้านล่างที่เซลล์เกาะอยู่
4. เติม 1X PBS เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง 1-2 รอบ เพื่อให้เอนไซม์ trypsin ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากนั้น trypsinized cells ด้วย 0.25% Trypsin-EDTA นำไปบ่มในตู้บ่ม incubate 37 °C ที่มี 5% CO₂ ประมาณ 3 นาที (แล้วแต่ชนิดของเซลล์) เมื่อครบเวลาแล้วนำไปส่อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เคาะๆเบาให้เซลล์พร้อมหลุดออกจาก culture flask และ Inhibit cell ด้วย complete medium ในอัตราส่วน 1:3 เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin

หมายเหตุ : หากพบว่าเซลล์หลุดน้อยให้ทำการย้ายเซลล์ลงในหลอดทดลอง 15 ml และเริ่มขั้นตอน การเติม 0.25% Trypsin-EDTA ใหม่

5. จากนั้นนำไป centrifuge โดยกำหนด condition ที่อุณหภูมิ 25 °C 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
6. หลังจากครบเวลาแล้ว ดูเฉพาะส่วน supernatant ที่อย่างระมัดระวัง
7. เติม complete medium 1 mL เคาะๆ เพื่อละลายตะกอนเซลล์ และทำการนับเซลล์ให้มีปริมาณเท่ากัน (ตามรายละเอียดใน SOP-Cell Culture Protocol SOP-LAB-XX) หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งอย่างระมัดระวังและเติม 1X PBS นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างอาหาร เลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง 1-2 รอบ หรือจนกว่าจะไม่มีการผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่

หมายเหตุ : ห้ามขีดเซลล์ (Cell Scraper) เนื่องจากอาจทำให้ ATP ที่อยู่ในเซลล์หลุดหายไป ในขั้นตอนนี้ นำตัวอย่างตะกอนเซลล์ที่ได้ เก็บไว้ที่ -80 °C เพื่อใช้งานต่อไป ADP-Glo™ Kinase Assay

นำตัวอย่างตะกอนเซลล์ที่ได้ แยกเซลล์ด้วยเครื่อง ultrasonic probe sonicator ด้วยสารละลาย

1X Kinase buffer

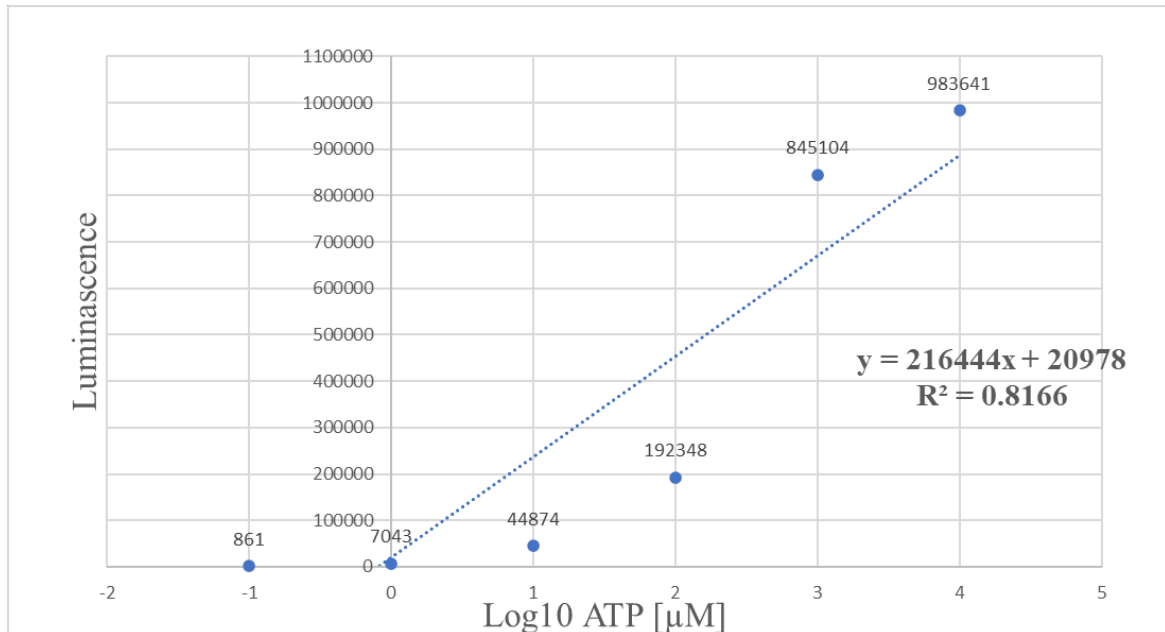
นำตัวอย่าง 5 µL หยดลงบน 384-well plate เติม DI 20 µL ทุกหลอด หลังจากนั้นเติม ADP- Glo™ reagent 5 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลาเติม kinase detection reagent 10 µL บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

หมายเหตุ : การเตรียม Blank ใช้ 1X Kinase buffer แทนตัวอย่าง

นำไปวัด luminescence ด้วยเครื่อง Microplate reader นำค่าที่ได้ไปเทียบกับค่า standard

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า KR และ KS สามารถเพิ่มปริมาณ ATP ภายในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ 18.82 และ 17.52 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ปกติ แสดงข้อมูลดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 กราฟ ATP standard

ตารางที่ 1 ปริมาณ ATP

	ครั้งที่ 1	Mean	ปริมาณ ATP ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ untreated
Untreated	11.26	17.63	14.44
KR	289.22	254.14	271.68
KS	273.34	232.54	252.94