บทที่ 3

การทดลอง สารเคมีและอุปกรณ์

1. การคัดเลือกหนูทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลเรื้อรังของกวาวเครือขาวต่อการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์และฮอร์โมนเพศ ในหนูแรทโตเต็มวัยเพศเมีย

เลือกหนูแรทโตเต็มวัยเพศเมียพันธุ์วิสตาร์ (Wistar rat) จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง หน่วยวิจัยไพรเมท คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อายุ 100±10 วัน น้ำหนัก 170-220 กรัม ที่ทำการตรวจดูเยื่อบุช่องคลอด (vaginal smear) แล้วพบว่ามีรอบวงสืบพันธุ์ (estrous cycle) ปกติติดต่อกันนาน 3 รอบวง จำนวน 20 ตัว

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของเรื้อรังกวาวเครือขาวต่อการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์และฮอร์โมนเพศ ในหนูแรทแก่เพศเมีย

เลือกหนูแรทแก่เพศเมียพันธุ์วิสตาร์ จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง หน่วยวิจัยไพรเมท คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อายุประมาณ 1 ปี น้ำหนัก 320-420 กรัม ที่ทำการตรวจดูเยื่อบุช่องคลอด นาน 14 วัน (เป็นระยะเวลานานประมาณ 3 รอบวงของวงสืบพันธุ์ปกติ) และไม่พบรอบวงสืบพันธุ์ จำนวน 20 ตัว

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการต่อต้านการเกิดมะเร็งเต้านมในหนูแรทโตเต็มวัยเพศเมียที่ชักนำให้เป็นมะเร็งเต้านม โดยสาร 7,12-Dimethylbenz (a) anthracene (7, 12-DMBA)

เลือกหนูแรทเพศเมียพันธุ์วิสตาร์ จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง หน่วยวิจัยไพรเมท คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อายุ 50 วัน (Kesara, 1987) น้ำหนัก 120-160 กรัม จำนวน 100 ตัว

เลี้ยงหนูรวมกันกรงละ 5 ตัว โดยใช้กรงที่ทำจากเหล็กไร้สนิม ขนาดของกรงกว้าง 24.5 ซม. ยาว 46 ซม. สูง 14 ซม. ขนาดของตาข่ายที่ปิดฝากรงมีขนาด 0.85 ซม. x 0.85 ซม.โดยเลี้ยงในเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งควบคุมอุณหภูมิห้อง (25 ± 1องศาเซลเซียส) และควบคุมแสงสว่าง (ให้แสงสว่างจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ วันละ 14 ชั่วโมง ระหว่างเวลา 06.00-20.00 น. และมืด 10 ชั่วโมง ระหว่างเวลา 20.00-

0.600 น. ด้วยเครื่องควบคุมอัตโนมัติ) พร้อมทั้งให้อาหารสำเร็จรูป (บริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์, กรุงเทพ) และน้ำดื่มตลอดเวลา

2. ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลเรื้อรังของกวาวเครือขาวต่อการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์และฮอร์โมนเพศ ในหนูแรทโตเต็มวัยเพศเมีย

ในการทดลองแบ่ง หนูแรทโตเต็มวัยเพศเมีย จำนวน 20 ตัว ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้น้ำกลั่นในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน ทางปากนาน 200 วัน

กลุ่มที่ 2 ให้ผงกวาวเครือขาวปริมาณ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทางปากนาน 200 วัน

ขั้นตอนการทำการทดลอง

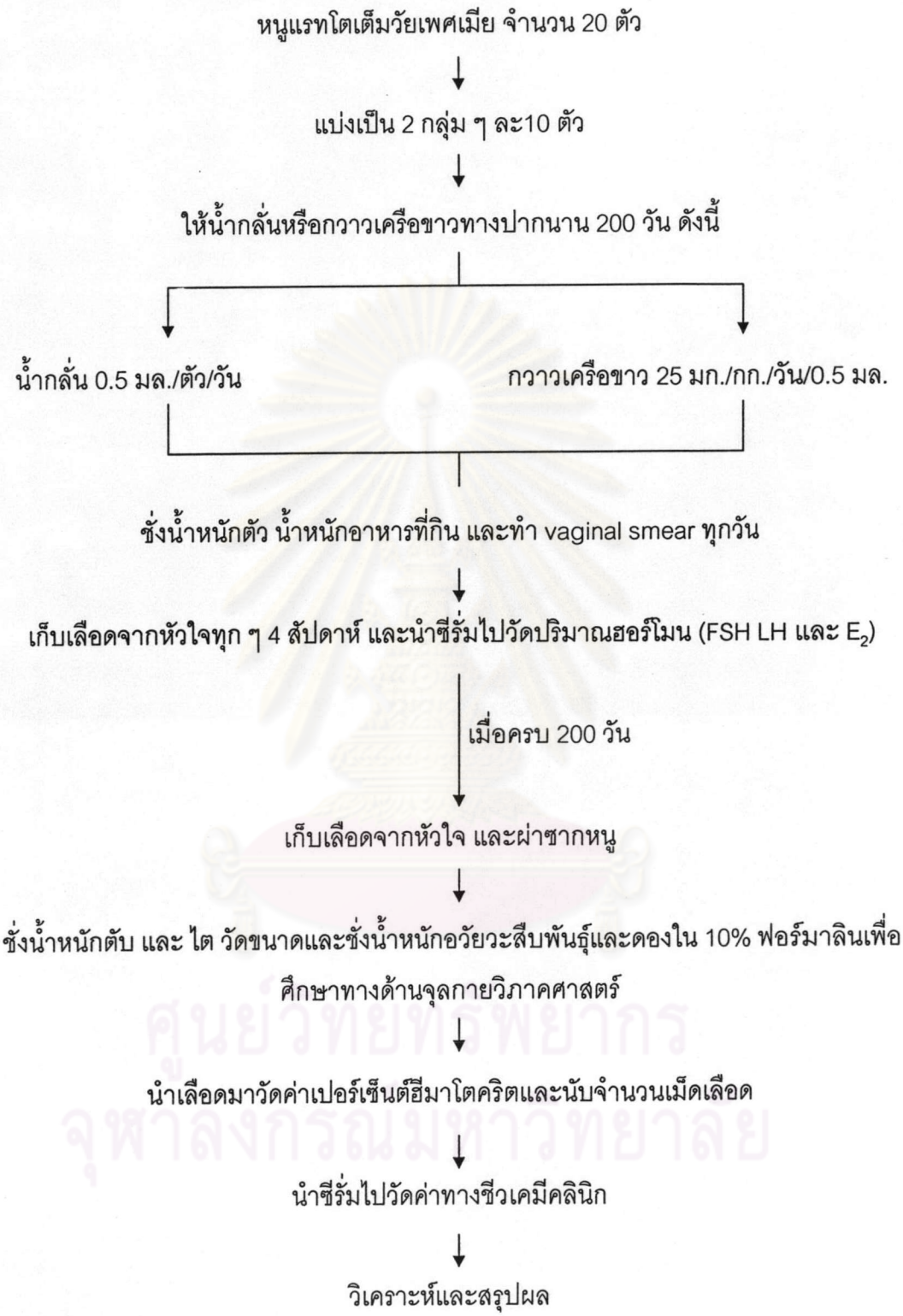
1. ทำการชั่งน้ำหนักตัวหนู น้ำหนักอาหารที่หนูกิน และตรวจดูเยื่อบุช่องคลอดทุกวัน

2. ทำการเก็บเลือดจากหัวใจแบบปิด ครั้งละ 2 มิลลิลิตร ทุก ๆ 4 สัปดาห์ นำเลือดไปปั่นแยกเก็บซีรั่ม และนำซีรั่มที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน FSH, LH และ E_2 โดยวิธี radioimmunoassay (RIA)

3. เมื่อทำการทดลองครบ 200 วัน งดให้อาหารแก่หนูนาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเลือดจากหัวใจและฆ่าหนูเพื่อพิสูจน์ซาก ดังนี้

- สลบหนูด้วยอีเทอร์ในขวดโหล
- ผ่าตัดเปิดหน้าท้อง และตัดเอาอวัยวะที่สำคัญได้แก่ ตับ ไต มดลูก และรังไข่ออกมา
- ชั่งน้ำหนักตับ และ ไต วัดขนาดและชั่งน้ำหนักมดลูก และรังไข่ทั้ง 2 ข้าง และดองอวัยวะทั้งหมดที่กล่าวมาใน 10% ฟอร์มาลิน เพื่อนำไปศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ โดยส่งตัวอย่างเนื้อเยื่อไปที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- นำเลือดมาวัดค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต และนับจำนวนเม็ดเลือดขาว เช่น ลิมโฟซัยต์ โมโนซัยต์ อิโอสิโนฟิล และนิวโตรฟิล และนำซีรั่มมาวิเคราะห์หาค่าทางชีวเคมีคลินิก คือ Blood urea nitrogen (BUN) Creatinine kinase Uric acid Total cholesterol Triglyceride Alkaline phosphatase Serum glutamic oxaloacetic acid transaminase (SGOT) และ Serum glutamic pyruvic acid transaminase (SGPT) โดยการตรวจวัดค่าดังกล่าวจะทำโดยส่งตัวอย่างไปที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>แผนผังการทดลอง</u>



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลเรื้อรังของกวาวเครือขาวต่อการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์และฮอร์โมนเพศ ในหนูแรทแก่เพศเมีย

ในการทดลองแบ่ง หนูแรทแก่เพศเมีย จำนวน 20 ตัว ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้น้ำกลั่นในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน ทางปากนาน 200 วัน

กลุ่มที่ 2 ให้ผงกวาวเครือขาวปริมาณ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทางปากนาน 200 วัน

ขั้นตอนการทำการทดลอง

ทำการทดลอง เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1

แผนผังการทดลอง

ทำการทดลอง เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการต่อต้านการเกิดมะเร็งเต้านมในหนูแรทโตเต็มวัยเพศเมียที่ชักนำให้เป็นมะเร็งเต้านม โดยสาร 7,12-DMBA

ในการทดลองแบ่งหนูแรทเพศเมีย จำนวน 100 ตัว ออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 25 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ชักนำให้เป็นมะเร็งเต้านมโดยใช้ 7,12-DMBA ในขนาด 170 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (Kesara Na Bangchang, 1987) ทางสายยางส่งเข้ากระเพาะ เพียงครั้งเดียวในวันที่1 ของการทดลองวันต่อมาให้น้ำกลั่นในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน ทางปากเป็นเวลา 150 วัน

กลุ่มที่ 2 ชักนำให้เป็นมะเร็งเต้านมโดยใช้ 7,12-DMBA ในขนาด 170 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทางสายยางส่งเข้ากระเพาะ เพียงครั้งเดียวในวันที่1 ของการทดลอง วันต่อมาให้ผงกวาวเครือขาวปริมาณ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทางปากเป็นเวลา 150 วัน

กลุ่มที่ 3 ให้น้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 90 วัน แล้วชักนำให้เป็นมะเร็งเต้านมโดยใช้ 7,12-DMBA ปริมาณ 170 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทางสายยางส่งเข้ากระเพาะ เพียงครั้งเดียวในวันที่ 91 ของการทดลอง วันต่อมาให้น้ำกลั่นในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน ทางปากเป็นเวลา 150 วัน

กลุ่มที่ 4 ให้ผงกวาวเครือขาวปริมาณ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 90 วัน แล้วชักนำให้เป็นมะเร็งเต้านมโดยใช้ 7,12-DMBA ปริมาณ 170 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทางสายยางส่งเข้ากระเพาะ เพียงครั้งเดียวในวันที่ 91 ของการทดลอง วันต่อมาให้น้ำกลั่นในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน ทางปากเป็นเวลา150 วัน

ขั้นตอนการทำการทดลอง

1. ทำการชั่งน้ำหนักตัวหนู และน้ำหนักอาหารที่หนูกิน และตรวจดูเยื่อบุช่องคลอดทุกวัน

2. ทำการสังเกตการเกิดมะเร็งเต้านมโดยการคลำที่บริเวณเต้านมทุกเต้าทุกสัปดาห์ ถ้าพบก้อนเนื้อบริเวณเต้านมจะสังเกตลักษณะและบันทึกรายละเอียดไว้ดังนี้

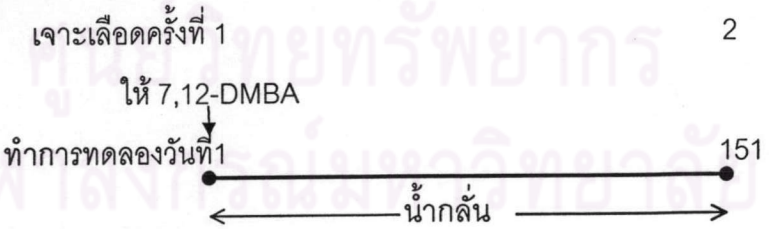
- วัดขนาดโดยใช้ vernia caliper ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนตามแนวนอน (horizontal) และแนวตั้ง (vertical) หาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางและนำผลที่ได้ในแต่ละครั้งมาเปรียบเทียบกันในการติดตามผล
- สังเกตตำแหน่งที่พบ
- สังเกตว่าคลำขอบเขต (boundery) ของก้อนได้ชัดเจนหรือไม่
- สังเกตลักษณะพื้นผิว (surface) ของก้อน
- สังเกตความอ่อนและแข็งของก้อน

3. ทำการเก็บเลือดจากหัวใจแบบปิด ครั้งละ 1 มิลลิลิตร ในวันที่ 1 และ 151 ในกลุ่มที่ 1 และ 2 และในวันที่ 1 90 และ 242 ในกลุ่มที่ 3 และ 4 แล้วนำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน E_2 โดยวิธี RIA

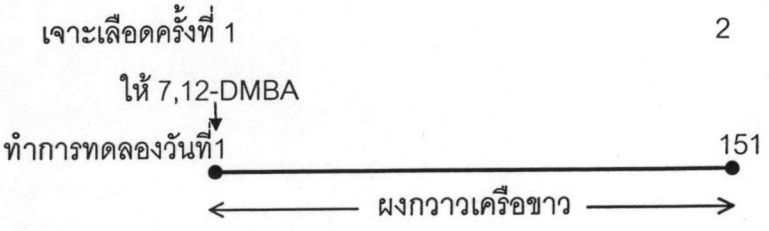
4. หลังจากทำการทดลองครบ 91 วัน ในกลุ่มที่ 1 และ 2 และครบ 242 วัน ในกลุ่มที่ 3 และ 4 ทำการฆ่าหนูเพื่อพิสูจน์ซากและตัดเอาชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณเต้านมที่พบลักษณะเป็นก้อน ไปศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยส่งตัวอย่างเนื้อเยื่อไปที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

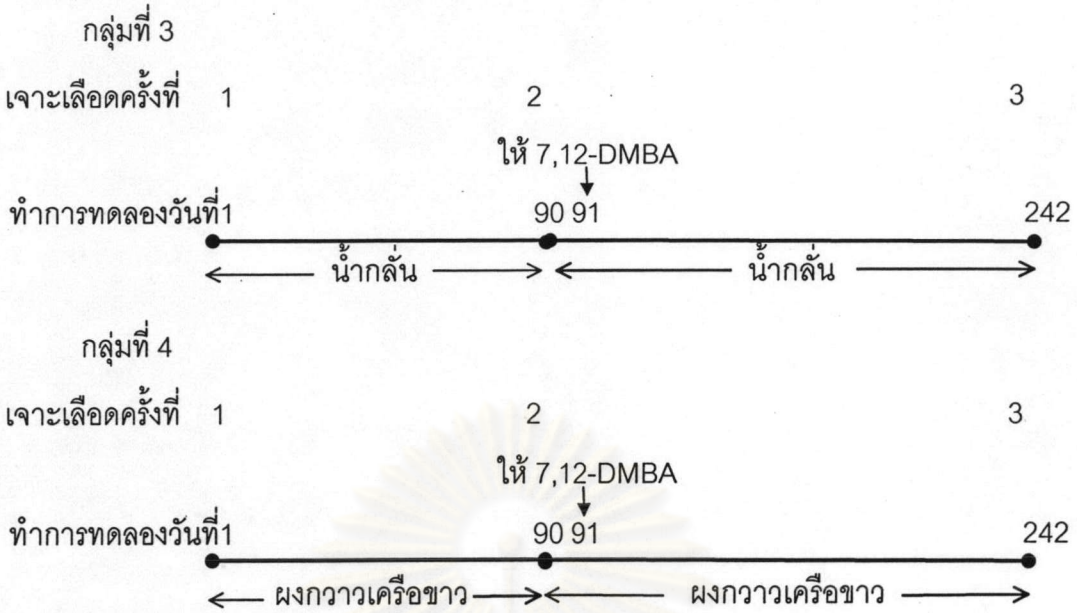
แผนผังการทดลอง

กลุ่มที่ 1



กลุ่มที่ 2





หนูแรทโตเต็มวัยเพศเมีย จำนวน 100 ตัว

↓

แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 25 ตัว ดังกลุ่มการทดลองข้างต้น

↓

ชั่งน้ำหนักตัว น้ำหนักอาหารที่หนูกินและทำ vaginal smear ทุกวัน

↓

สักเกตการเกิดมะเร็งเต้านมและบันทึกรายละเอียดทุกสัปดาห์

↓

เก็บเลือดจากหัวใจทุก ๆ 90 วัน หรือ 150 วัน นำซีรั่มไปวัดฮอร์โมน E_2

↓

ฆ่าหนูเพื่อพิสูจน์ซาก และนำชิ้นเนื้อเยื่อที่คาดว่าจะเป็นมะเร็งไป
ศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์

↓

วิเคราะห์และสรุปผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดหนูจากหัวใจแบบปิด (Cardiac puncture) ครั้งละ 2 มิลลิลิตร. โดยใช้อีเทอร์เป็นยาสลบ ใช้กระบอกฉีดขนาด 2.5 มล.และเข็มฉีดยาเบอร์ 25 x ½ " หรือ 26 x ½ " ระหว่างช่วงเวลา 08.00-09.00 น. นำเลือดที่ได้ไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แยกซีรั่มไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน FSH LH และ E_2 ต่อไป

4. การตรวจรอบวงสืบพันธุ์

การตรวจรอบวงสืบพันธุ์ จะทำระหว่างช่วงเวลา 09.00-10.00 น. โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Long & Evan (1922) ทำโดยใช้แท่งแก้วปลายมนที่ทำความสะอาดด้วยอัลกอฮอล์ 70% แล้วจุ่มในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) สอดเข้าภายในช่องคลอดหนูแรท และให้ปลายแท่งแก้วแตะกับผนังช่องคลอดเบา ๆ แล้วเอาออกมาแตะหยดน้ำเกลือบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ว่าเป็นเซลล์ชนิดใดและบันทึกผล

5. การเตรียมและป้อนกวาวเครือขาว

นำกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) สายพันธุ์วิชัย-3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. วิชัย เชิดชีวศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เก็บในฤดูกาลและแหล่งเดียวกัน อบส่วนหัวที่ฝานเป็นชิ้นบาง ๆ ที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส มาบดเป็นผงให้มีขนาด 100 mesh เก็บในภาชนะปิดสนิท เตรียมสำหรับใช้โดยนำไปละลายในน้ำกลั่น ป้อนสารแขวนลอยของกวาวเครือขาวแก่หนูแรทระหว่างช่วงเวลา 10.00-11.00 น. โดยใช้ gastric feeding needle ขนาด 18x2 ½ " และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร

6. การชักนำให้หนูเป็นมะเร็งเต้านม

การเตรียมสารก่อมะเร็ง

ละลายสารก่อมะเร็ง7,12-Dimethylbenz (a) anthracene (7, 12-DMBA) จาก Sigma Chemical Company, U.S.A. (Lot No. 34F-0390) ในน้ำมันข้าวโพด (Mazola, Thailand) ขนาด 2% น้ำหนัก/ปริมาตร และทำให้ละลายโดยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที จากนั้นเก็บสารที่เตรียมได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (Kesara, 1987)

การให้สารละลายก่อมะเร็ง

ให้สารละลายก่อมะเร็งทางปากส่งเข้ากระเพาะอาหาร ตามวิธีของ Huggin และคณะ (1959) และ (1961) โดยใช้สายยางขนาดเล็กและอ่อน (No. 0471) ยาว 4 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง

0.1 เซนติเมตร. ต่อเข้ากับเข็มฉีดยาและกระบอกฉีดยา ค่อย ๆ สอดเข้าทางปาก ค่อย ๆ ดันกระบอกฉีดยาเพื่อส่งสารละลายก่อมะเร็งเข้ากระเพาะ โดยก่อนให้สารก่อมะเร็งควรอดอาหารหนูทดลองเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

7. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (radioimmunoassay : RIA)</u>

ตรวจหาปริมาณ FSH และ LH โดยดำเนินการตามวิธีของ Watanabe *et al.*(1990) และตรวจหาปริมาณ E_2 โดยดำเนินการตามวิธีของ WHO programme (Sufi *et al.*, 1986)

7.1 <u>การหาปริมาณฮอร์โมน FSH</u>

<u>สารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณ FSH</u> ได้แก่

1) ฮอร์โมน Follicle stimulating hormone Standard

Batch No. NIDDK-rFSH-RP-2 (AFP-4621B), National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Disease (NIDDK), Japan

2) แอนติซีรัม (Antiserum to FSH)

Batch No. NIDDK-anti-rFSH-S-11 (AFPCO972881), NIDDK, Japan

3) สารติดสลากรังสี

Follicle stimulating hormone : NIDDK-rFSH-I-8 (AFP-11454B), NIDDK, Japan

<u>สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน FSH โดยวิธี RIA</u>

- Natrium dihydrogen phosphate-Monohydrated : ($NaH_2PO_4.H_2O$)
  E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) : BDH Chemical Ltd. England.
- Sodium chloride (NaCl) : BDH Chemical Ltd. England.
- Thiomerosal (merthiolate) : Sigma Chemical Company U.S.A.
- Gelatin : Difco laboratory, U.S.A.
- Ethanol (Absolute) : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Methanol (CH_3OH) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน FSH โดยวิธี RIA

1. Gammar counter
2. Dunoff Incubator shaker : Model 3575-1, Lab-Line Instrument Inc., U.S.A.
3. Dynac Centrifuge : Clay Adams, Becton Dickinson and Company U.S.A.
4. Foam decanting rack-DPC, U.S.A.
5. Laminar flow
6. Magnetic Stirrer bars S-18520, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
7. Micropipette ขนาด 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

   Nichiyo Model 5000 Japan

   Nichiyo Model 8100

   Eppendorff 3130 Germany
8. Vortex mixer : M-16715, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
9. Syring terumo with needle 1 ml, 2.5 ml และ 5 ml
10. PH meter : Corning pH meter 240 Cat No. 476530
11. Refrigerated Centrifuge : Model PR-J, International Equipment Company, U.S.A.
12. เครื่องชั่งละเอียด : Right A Weight, W.M.

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 M PBS-0.1% NaN_3 pH 7.6

1. เตรียมสารละลาย A และ B ตามวิธีต่อไปนี้

   สารละลาย A ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 0.05 M $Na_2HPO_4.12H_2O$ (MW : 358.14) เป็นเบส ชั่งมา 35.814 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 2 ลิตร

   สารละลาย B ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 0.05 M $Na_2PO_4.2H_2O$ (MW : 156.10) เป็นกรด ชั่งมา 7.801 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. เทสารละลาย B ลงในสารละลาย A วัด ปรับ pH ให้ได้ 7.6
3. เติม NaN_3 2 กรัม/ 2 ลิตร
4. เติม 0.14 M NaCl 16.364 กรัม/ 2 ลิตร
5. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 1 เดือน

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 M PBS-0.1% NaN_3 –0.05 M EDTA-1% NRS pH 7.6

1. เติม EDTA ลงในบัฟเฟอร์ทำให้ pH ลดลง ปรับ pH ให้ได้ 7.6 โดยใช้ 5.0 M NaOH
2. เติม NRS

การเตรียม FSH tracer

เตรียมโดยใช้ lyophilized FSH tracer (NIDDK-rFSH-I-8 (AFP-11454B)) จาก NIDDK, Japan โดย FSH tracer ที่ได้จะอยู่ใน ampule และมีปริมาณ 100 ไมโครกรัม/ampule ละลาย lyophilyzed FSH tracer โดย เติม assay buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเก็บสารละลายที่ได้ หลอดละประมาณ 20-25 ไมโครกรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส อายุการใช้งานไม่เกิน 4-6 เดือน ละลาย FSH tracer ใช้ 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-0.1% BSA ค่า cpm ที่ใช้ประมาณ 4,000-5,000 cpm/50 ไมโครลิตร

การเตรียม FSH antisera

เตรียมโดยใช้ FSH antisera (NIDDK-anti-rFSH-S-11 (AFP-CO972881)) จาก NIDDK, Japan การทำให้ FSH antisera อยู่ในสภาพ lyophilized ละลาย FSH antisera โดยเติม 1:12.5 (2% normal rabbit serum (NRS):assay buffer) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้แห้ง (lyophilized) การนำมาใช้ทำโดย ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มล.เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เตรียมสำหรับใช้ทำโดยนำมาเติม 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-0.05 M EDTA-1% NRS (pH 7.6) จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 : 125,000

การเตรียม FSH standard

เตรียมโดยใช้สารมาตรฐาน FSH (NIDDK-rFSH-RP-2 (AFP-4621B)) จาก NIDDK, Japan สารมาตรฐาน FSH lyophilyzed ที่ได้จะอยู่ใน ampule ในสารละลาย 1% BSA phosphosaline buffer 1 มล.มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเก็บสารละลายที่ได้หลอดละ 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 3-5 เดือน

วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

1. เตรียมหลอดพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด และเขียนลำดับที่ของสารมาตรฐานลงบนหลอด
2. เติม 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-1% BSA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในทุก ๆ หลอด
3. นำสารมาตรฐานที่แช่แข็งอยู่ (1000 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร: สารมาตรฐานลำดับที่ 1) ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย จากนั้นเขย่าสารโดยใช้ vortex นำมาทำ serial dilution ดังตาราง

ตารางที่ 2 แสดงการเตรียมสารมาตรฐาน FSH

ลำดับที่	ความเข้มข้น	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	Assay buffer (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร)
1	stock solution	1	-	1000
2	1	1	1	500
3	2	1	1	250
4	3	1	1	125
5	4	1	1	62.5
6	5	1	1	31.25
7	6	1	1	15.626
8	7	1	1	7.8125
9	8	1	1	3.906
10 (NSB)	9	-	1	0

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ FSH โดยวิธี RIA

1) ปิเปตซีรั่ม 50 ไมโครลิตร ลงใน microfuge tube ตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate) เติม 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-1% BSA หลอดละ 50 ไมโครลิตร

2) ปิเปตสารมาตรฐานลำดับที่ 1 ถึง 9 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และลำดับที่ 10 (NSB) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงใน microfuge tube ลำดับละ 3 หลอด (triplicate)

3) นำ microfuge tube มา 2 หลอด เติม 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-1% BSA หลอดละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ Maximum binding (Tbo)

4) ปิเปต 1^{st} Ab 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

5) ปิเปต FSH tracer 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ microfuge tube เขย่าให้เข้ากัน (ห้ามใช้ vortex) incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

6) ปิเปต FSH tracer 50 ไมโครลิตร ใส่ counting vial นำมาเติม 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-0.1% BSA 250 ไมโครลิตร จำนวน 2 vial เพื่อหา total count

7) การแยก free form และ bound form ด้วย 2^{nd} Ab = ARGG (anti rabbit goat globulin) ปิเปต 2^{nd} Ab 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน (ห้ามใช้ vortex) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

8) นำไปปั่นแยกเอาส่วน free form ออกที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3) ระเหยให้เหลือแต่ bound form ใส่ใน counting แล้วนำไปตรวจวัดระดับฮอร์โมนด้วยเครื่อง Gamma-counter

ขั้นตอนการวัดระดับฮอร์โมน FSH

ขั้นตอนการวัดแสดงได้ด้วยตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนการวัดระดับฮอร์โมน FSH

หลอดทดลอง	Assay buffer (ไมโครลิตร)	FSH Tracer (ไมโครลิตร)	1st Antibody (ไมโครลิตร)	Incubation (ชั่วโมง)	2nd Antibody (ไมโครลิตร)
TC	250	50	-	-	-
NSB	150	50	-	144	100
Tbo	100	50	50	144	100
Sample Or Std	100	50	50	144	100

* หมายเหตุ

TC = Total count

NSB = Non specific binding

Tbo = Maximum binding

การคำนวณผลทาง RIA

• กราฟมาตรฐาน

นำค่า cpm ของ standard แต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้วลบออกด้วย NSB (X-NSB) นำแต่ละค่าไปคำนวณหา ค่า cpm แล้วนำไป plot กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็นพิโคกรัม/100 ไมโครลิตร บนกระดาษกราฟกึ่งล็อก (semiloq)

• ตัวอย่างซีรั่ม

นำค่า cpm ของแต่ละตัวอย่างซีรั่ม ซึ่งเป็น duplicate มาหาค่าเฉลี่ยลบออกด้วย NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานได้ค่าเป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร

7.2 การหาปริมาณฮอร์โมน LH

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณ LH ได้แก่

1) ฮอร์โมน Luteinizing hormone Standard

Batch No. NIDDK-rLH-RP-3 (AFP-7187B), NIDDK, Japan

2) แอนติซีรัม (Antiserum to LH)

Batch No. NIDDK-anti-rLH-S-10, NIDDK, Japan

3) สารติดสลากรังสี

Luteinizing hormone : NIDDK-rLH-I-8 (AFP-11536B), NIDDK, Japan

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน LH โดยวิธี RIA

เช่นเดียวกันกับสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน FSH

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน LH โดยวิธี RIA

เช่นเดียวกันกับอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน FSH

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 M PBS-0.1% NaN_3 pH 7.6 และ การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 M PBS-0.1% NaN_3 –0.05 M EDTA-1% NRS pH 7.6

สารเคมีและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกันกับการเตรียมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน FSH

การหาปริมาณฮอร์โมน LH ทำโดยวิธี RIA ตามวิธีของ Dr. A.F. Parlow, เป็นวิธีที่ตรวจวิเคราะห์ pituitary hormones ในซีรั่มที่ได้ผลเที่ยงตรง (accuracy) แม่นยำ(precision) มีความไวสูง (sensitivity) วิเคราะห์ได้เร็ว และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูง

การเตรียม LH tracer

เตรียมโดยใช้ lyophilyzed LH tracer (NIDDK-rLH-I-8 (AFP-11536B)) จาก National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Disease (NIDDK), Japan โดย LH tracer ที่ได้จะอยู่ใน ampule และมีปริมาณ 100 ไมโครกรัม/ampule ละลาย lyophilyzed LH tracer โดย เติม assay buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเก็บสารละลายที่ได้ หลอดละประมาณ 20-25 ไมโครกรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส อายุการใช้งานไม่เกิน 2-3 เดือน ละลาย LH tracer ใช้ 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-0.1% BSA ค่า cpm ที่ใช้ประมาณ 4,000-5,000 cpm/50 ไมโครลิตร

การเตรียม LH antisera

เตรียมโดยใช้ LH antisera (NIDDK-anti-rLH-S-10) จาก NIDDK, Japan การทำให้ LH antisera อยู่ในสภาพ lyophilized ละลาย LH antisera โดยเติม 1:18.75 (2% normal rabbit serum (NRS):assay buffer) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้แห้ง (lyophilized) การนำมาใช้ทำโดยละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เตรียมสำหรับใช้ทำโดยนำมาเติม 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-0.05 M EDTA-1% NRS (pH 7.6) จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 : 180,000

การเตรียม LH standard

เตรียมโดยใช้สารมาตรฐาน LH (NIDDK-rLH-RP-3 (AFP-7187B)) จาก NIDDK, Japan) สาร lyophilyzed ที่ได้จะอยู่ใน ampule ในสารละลาย 1% BSA phosphosaline buffer 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 3-5 เดือน

วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

1. เตรียมหลอดพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด และเขียนลำดับที่ของสารมาตรฐานลงบนหลอด

2. เติม 0.05 M PBS-0.1% NaN_3-1% BSA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในทุก ๆ หลอด

3. นำสารมาตรฐานที่แช่แข็งอยู่ (1000 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร : สารมาตรฐานลำดับที่ 1) ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย จากนั้นเขย่าสารโดยใช้ vortex นำมาทำ serial dilution ดังตาราง

ตารางที่ 4 แสดงการเตรียมสารมาตรฐาน LH

ลำดับที่	ความเข้มข้น	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	Assay buffer (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร)
1	stock solution	1	-	1000
2	1	1	1	500
3	2	1	1	250
4	3	1	1	125
5	4	1	1	62.5
6	5	1	1	31.25
7	6	1	1	15.626
8	7	1	1	7.8125
9	8	1	1	3.906
10 (NSB)	9	-	1	0

การคำนวณผลทาง RIA

• กราฟมาตรฐาน

นำค่า cpm ของ standard แต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้วลบออกด้วย NSB (X-NSB) นำแต่ละค่าไปคำนวณหา ค่า cpm แล้วนำไป plot กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็นพิโคกรัม/100 ไมโครลิตร บนกระดาษกราฟกึ่งล็อก (semiloq)

• ตัวอย่างซีรั่ม

นำค่า cpm ของแต่ละตัวอย่างซีรั่ม ซึ่งเป็น duplicate มาหาค่าเฉลี่ยลบออกด้วย NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานได้ค่าเป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร

7.3 การหาปริมาณฮอร์โมน E_2

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณ E_2 ได้แก่

1) ฮอร์โมน Estradiol Standard

   Batch No. 81/J, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland.

2) แอนติซีรัม (Antiserum to Oestradiol E_2)

   Cloned 2F9 ,Department of Biology Regulation, Weizmann Institute of Science, Israle.

3) สารติดสลากรังสี

   ^{3}H- estradiol : Amersham International, Plc, England.

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน E_2 โดยวิธี RIA

- Charcoal reagent : WHO RIA Reagent Programme Switzerland.
- Dextran reagent : WHO RIA Reagent Programme Switzerland.
- Dietyl ether $(C_2H_5)_2O$: E. Merk, Darmstadt, Germany.
- Natrium dihydrogen phosphate-Monohydrated : $(NaH_2PO_4.H_2O)$ E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) : BDH Chemical Ltd. England.
- Sodium chloride (NaCl) : BDH Chemical Ltd. England.
- Thiomerosal (merthiolate) : Sigma Chemical Company U.S.A.
- Gelatin : Difco laboratory, U.S.A.

- Toluene P.a. (C_7H_8) : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Art. 3115-1-4-Dioxane ($C_4H_8O_2$) : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Art. 2946 PPO (2,5 diphenyloxozol) ($C_{15}H_{11}NO$) E. Merck, Darmstadt, Germany.
- POPOP [1,4-bis(2-(5-phenyloxazol))]-Benzene,phenyloxazo. lyphenyloxazolyl phenyl anhydrous : Sigma Chemical Company, U.S.A.
- Ethanol (Absolute) : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Ethanol (95%) : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Methanol (CH_3OH) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

<u>อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน E_2 โดยวิธี RIA</u>

1. Beta counter : Model 1218 Rack Beta LKB Wallac, Finland
2. Dri-Block Heater : Model DB-3, Tecam Laboratory and Industrial Equipment U.S.A.
3. Dunoff Incubator shaker : Model 3575-1, Lab-Line Instrument Inc., U.S.A.
4. Dynac Centrifuge : Clay Adams, Becton Dickinson and Company U.S.A.
5. Laminar flow
6. Magnetic Stirrer bars S-18520, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
7. Micropipette : 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
   Nichiyo Model 5000 Japan
   Nichiyo Model 8100
   Eppendorff 3130 Germany
8. Vortex mixer : M-16715, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
9. Syring terumo with needle 1 ml, 2.5 ml และ 5 ml
10. PH meter : Corning pH meter 240 Cat No. 476530
11. Refrigerated Centrifuge : Model PR-J, International Equipment Company, U.S.A.
12. เครื่องชั่งละเอียด : Right A Weight, W.M.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การหาปริมาณฮอร์โมน E_2 ทำโดยวิธี RIA ตามวิธีของ WHO programme (Sufi *et al.*, 1986) เป็นวิธีที่ตรวจวิเคราะห์ sex steriods ในซีรัมได้ผลเที่ยงตรง (accuracy) และแม่นยำ (precision) มีความไวสูง (sensitivity) วิเคราะห์ได้เร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (specificity)

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

ละลาย gelatin 1.00 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร โดยอุ่นให้ gelatin ละลายจนหมด ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	2.35	กรัม
disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	11.60	กรัม
sodium chloride	8.80	กรัม
thimersal	0.10	กรัม

คนให้ละลายจนหมดปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 1 เดือน

การเตรียม Charcoal suspension

ละลาย dextrane 0.0625 กรัม ใน assay buffer 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม charcoal 0.625 กรัม เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 1 เดือน เมื่อจะใช้ต้องนำไปกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่ใช้

การเตรียม Scintillation fluid

toluene	1000	มิลลิตร
PPO	5	กรัม
dimethyl Popop	0.3	กรัม
dioxane	200	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลควรผสมทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

การเตรียม estradiol tracer

จาก (1,2,6,7, ^3H) estradiol ซึ่งละลายอยู่ใน toluene : absolute ethanol ในอัตราส่วน 9 : 1 เป็น estradiol stock tracer ที่มีความแรง 10 ไมโครคูรี่/มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ 100 นาโนคูรี่/มล. ด้วยการนำ estradiol stock tracer จำนวน 100 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วจึงเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ estradiol stock tracer ที่มีความแรง 100 นาโนคูรี่/มิลลิลิตร หรือประมาณ 10,000 cpm เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม estradiol antisera

estradiol antisera จาก Prof. Kohen Fortune, Israel ซึ่งอยู่ในสภาพที่ถูกทำให้แห้ง (lyophilized) นำมาเติมน้ำกลั่น 2 ครั้ง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเก็บสารละลายที่ได้หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นำมา 1หลอด เติมน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร สารภายในหลอดมีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นแบ่งเก็บสารละลายที่ได้หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำการละลายเช่นเดียวกับข้างต้นแต่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนน้ำกลั่น 2 ครั้ง จนได้สารละลายมีความเข้มข้น 1:1000 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้เป็น stock ใช้ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 : 20,000

การเตรียม estradiol standard

เตรียมโดยใช้สารมาตรฐานอีสตราไดออลจาก WHO ที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ดูดสารมาตรฐานมา 500 ไมโครลิตร ผสมสารละลาย assay buffer 4.5 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ เป็น stock solution นำ มา 2.0 มิลลิลิตร นำมาทำ serial dilution ดังตาราง

ตารางที่ 5 แสดงการเตรียมสารมาตรฐานอีสตราไดออล

ลำดับที่	ความเข้มข้น	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	Assay buffer (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (นาโนกรัม/0.5 มิลลิลิตร)
1	Stock solution	2.0	-	1.0
2	1	2.0	2.0	0.5
3	2	2.0	2.0	0.25
4	3	2.0	2.0	0.125
5	4	2.0	2.0	0.0625
6	5	2.0	2.0	0.03125
7	6	2.0	2.0	0.01562
8	7	2.0	2.0	0.00781
9	8	2.0	2.0	0.0390
10	9	2.0	2.0	0.00195

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล โดยวิธี RIA

การสกัดอีสตราไดออลด้วย อีเธอร์

1) ปิเปตซีรั่ม 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate)

2) เติมอีเธอร์หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานหลอดละ 1 นาที

3) ทำการแยกชั้น โดยนำหลอดทดลองที่อยู่ใน test tube rack วางบนถาดน้ำแข็งแห้งผสมกับ 95% ethanol ชั้นล่างของหลอดทดลองจะแข็งตัว ชั้นบนจะเป็นส่วนของฮอร์โมนที่ถูกสกัดออกมาด้วยอีเธอร์ เทส่วนบนลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง

4) นำหลอดทดลองชุดใหม่ไปทำให้อีเธอร์ระเหยออกไป ด้วยการทำให้แห้งโดยนำไปใส่ไว้ใน dry-block heater ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอีเธอร์ระเหยไปจนหมด

5) นำหลอดทดลองดังกล่าว มาเติม assay buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานหลอดละ 1 นาที เพื่อให้ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดออกมาละลายอยู่ใน buffer ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งนานหลอดละ 1 นาที

6) ปิเปต tracer 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน

7) ปิเปต antibody 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด

8) นำหลอดทดลองมา 2 หลอด เติม assay buffer หลอดละ 600 ไมโครลิตร ปิเปต tracer 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ Non specific binding (NSB)

9) นำหลอดทดลองมา 2 หลอด เติม assay buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร ปิเปต tracer 100 ไมโครลิตร และ antibody 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ Maximum binding (Tbo)

10) เขย่าให้เข้ากัน incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-20 ชั่วโมง

11) ปิเปต tracer 100 ไมโครลิตร ใส่ counting vial นำมาเติม buffer 800 ไมโครลิตร จำนวน 2 vial เพื่อหา total count

<u>การแยก free form และ bound form ด้วย charcoal suspension</u>

1) ปิเปต charcoal suspension 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2) นำไปปั่นแยกเอาส่วน free form ที่จับอยู่กับ charcoal suspension ออกที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3) เทส่วนที่เป็น bound form ที่อยู่ใน supernatant ใส่ใน counting vial เติม scintillation fluid หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวัดระดับฮอร์โมนด้วยเครื่อง Beta-liquid scintillation นานหลอดละ 5 นาที

ตารางที่ 6 แสดงขั้นตอนการวัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล

หลอดทดลอง	Assay buffer (ไมโครลิตร)	Tracer (ไมโครลิตร)	Antibody (ไมโครลิตร)	Incubation (ชั่วโมง)	Charcoal suspension (ไมโครลิตร)
TC	800	100	-	-	-
NSB	600	100	-	18-20	200
Tbo	500	100	100	18-20	200
Sample Or Std	500	100	100	18-20	200

การคำนวณผลทาง RIA

• กราฟมาตรฐาน

นำค่า cpm ของ standard แต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้วลบออกด้วย NSB (X-NSB) นำแต่ละค่าไปคำนวณหา ค่า cpm แล้วนำไป plot กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็นเฟมโตโมล/หลอด บนกระดาษกราฟกึ่งล็อก (semiloq)

• ตัวอย่างซีรั่ม

นำค่า cpm ของแต่ละตัวอย่างซีรั่ม ซึ่งเป็น duplicate มาหาค่าเฉลี่ยลบออกด้วย NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานได้ค่าเป็นพิโคโมล/ลิตร

8. การหาเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต การนับเม็ดเลือดขาว และการ Differential เม็ดเลือดขาว

สารเคมี

- EDTA
- Wright' s stain
- Buffer
- Wax สำหรับอุดปลายหลอดแก้วฝอย
- หลอดแก้วฝอย (cappillary tube) ชนิดที่ coat ด้วย heparin

อุปกรณ์

- เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Technicon รุ่น H3 จากบริษัท อีฟอร์แอล จำกัด
- แผ่นสไลด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- cover slip
- Light microscope
- เครื่องอ่านค่า haematocrit
- Haematocrit centrifuge

8.1 การหาเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต

1. นำเลือดบางส่วนจากการเจาะเลือดจากหัวใจ ปล่อยให้เลือดไหลเข้าหลอดแก้วฝอยทางปลายที่ไม่มีสี อย่างต่อเนื่องประมาณ 3/4 หลอด ปิดปลายหลอดแก้วฝอยด้านสีแดงด้วย wax

2. นำไปเข้าเครื่องปั่น (centrifuge) โดยวางให้ปลายด้านที่อุดด้วย wax อยู่ด้านนอกใช้เวลาปั่นประมาณ 5 นาที

3. จากนั้นนำหลอดแก้วฝอยไปอ่านค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต ด้วยเครื่องอ่าน

8.2 การนับเม็ดเลือดขาว

1. นำเลือดบางส่วนจากการเจาะเลือดจากหัวใจ 1 มล. นำมาใส่ในสารกันเลือดแข็ง EDTA จำนวน 0.1 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากัน

2. นำเข้าเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Technicon รุ่น H3

8.3 การหาค่า Differential เม็ดเลือดขาว

1. ใช้ EDTA blood 1 หยด หยดลงบนสไลด์แก้วที่ด้านใดด้านหนึ่งของแผ่นสไลด์

2. ใช้ cover slip ไถเลือดจากหยดเลือดไปยังด้านตรงข้ามทิ้งไว้ให้แห้ง

3. ย้อมเม็ดเลือดด้วยสี Wright's stain โดยราดสี Wright's stain ให้ท่วมเสมียร์เลือด ทิ้งไว้ 5 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง

4. ฉีด Buffer ลงไปบนสไลด์ในอัตราส่วนสี Wright's stain ต่อ Buffer เท่ากับ 1:1 ใช้ลูกยางเป่าให้สีกับ Buffer ให้ผสมกัน ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำเปล่าจนสะอาด

5. นำไปนับชนิดของเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

9. การหาค่าทางชีวเคมีคลินิกในซีรั่ม

9.1 การหาปริมาณไนโตรเจนของยูเรียในเลือด (BUN)

ใช้น้ำยาสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ urea (Kit : Ur'ee cin'etique UV 250) Enzymatic determination of urea (UREASE-GLDH) จากบริษัท bioM'erieux Vitek, Inc.U.S.A.

หลักการ

ใช้ยูรีเอส (urease) ไปย่อยยูเรียดังปฏิกิริยา

$$Urea + H_20 \xrightarrow{urease} 2NH_3 + CO_2$$

$$2NH_4^+ + 2\alpha\text{-ketoglutarate} + 2NADH_2 \xrightarrow{glutamate\ dehydrogenase} 2\ glutamate + 2NAD^+ + 2H_2O$$

และวัดหาปริมาณของ $2NH_3$ หรือ CO_2 ให้ NH_4^+ ทำปฏิกิริยากับ alphaketoglutarate และ $NADH_2$ โดยใช้เอ็นซัยม์ glutamate dehydrogenase (GLDH) จะได้กลูตาเมต และ NAD กับน้ำ ซึ่งอาจวัดอัตราการใช้ของ $NADH_2$ หรืออัตราการเกิดของ NAD ได้ก็คำนวณหายูเรียได้

สารเคมี

1) Reagent 1 (standard) urea 8.33 mmol/l (50 mg/100ml-0.5g/l)
2) Reagent 2 (buffer)
   - Tris buffer pH 8 50 mmol/l
   - α-ketoglutarate 4 mmol/l
3) Reagent 3 (Enzymes)
   - NADH 0.29 mmol/l
   - GLDH $\geq$ 1000 U/l
   - urease $\geq$ 5000 U/l
   - ADP 0.4 mmol/l

   น้ำยาทั้งหมดควรใช้ก่อนวันหมดอายุ และเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
4) น้ำยายูเรียมาตรฐาน

   Reagent 1 : 8.33 mmol/l (50 mg/100 ml-0.5 g/l) หรือใน ampules Ref.65 171
5) ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสม่า

   นำซีรั่มหรือพลาสม่าที่เก็บได้มาใส่ในสารกันการแข็งตัว EDTA หรือ heparin

วิธีทำ

Working solution :

เติม Reagent 2 ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ลงในขวด Reagent 3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 4 สัปดาห์ ที่ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ตารางการเตรียมสารการหาปริมาณไนโตรเจนของยูเรียในเลือด (BUN)

สาร	Standard	Sample
Working solution	1 ml	1ml
ตั้งทิ้งไว้ที่ 25 หรือ 30 องศาเซลเซียส		
Reagent 1 (standard) Sample	10 ul -	- 10 ul
ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ในช่วงเวลา 20 วินาที และ 80 วินาที จากค่ามากไปน้อย ใช้ช่วงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Hg 334) โดยใส่ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้อากาศหรือน้ำเป็น zero adjustment		

9.2 การหาค่าปริมาณ creatinine ในเลือด

น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ creatinine (Kit : Cr'etinine cin'etique) Kinetic determination of creatinine จากบริษัท bioM'erieux Vitek, Inc.U.S.A.

หลักการ

ครีอะตินีนใน protein-free filtrate ทำปฏิกิริยากับ alkaline picrate ทำให้เกิดสีเหลืองแดง เนื่องจาก tautomer ของครีอะตินีน พิเครต (Jeff'e reaction) และวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยสเปคโตรโฟโตมีเตอร์

สารเคมี

1) Reagent 1 (standard) creatinine 132.6 umol/l (1.5 mg/100ml-15 mg/l)
2) Reagent 2 (color reagent)
   picric acid 8.8 mmol/l
3) Reagent 3 (alkaline reagent)
   sodium hydroxide 0.4 mol/l
   sodium phosphate 50 mmol/l

IRRITANT REAGENT :

R 36/38 : irritating to eye and skin.

S 26 : In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

น้ำยาทั้งหมดควรใช้ก่อนวันหมดอายุ และเก็บที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส

4) ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสม่า

นำซีรั่มหรือพลาสม่าที่เก็บได้มาใส่ในสารกันการแข็งตัว EDTA หรือ heparin

วิธีทำ

Working solution :

Reagent 2	1	volume
Reagent 3	1	volume

สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 4 สัปดาห์ ที่ อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 8 ตารางการเตรียมสารการหาปริมาณ creatinine ในเลือด

Working solution	1 ml
ตั้งทิ้งไว้ที่ 25,30 หรือ 37 องศาเซลเซียส	
Reagent 1 (standard) or sample	100 ul
ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ในช่วงเวลา 20 วินาที และ 80 วินาที ใช้ช่วงความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (Hg 492) โดยใส่ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้อากาศหรือน้ำเป็น zero adjustment	

9.3 การหาปริมาณ uric acid

น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ uric acid (Kit : Acide urique enzymatique PAP 150) Enzymatic determination of uric acid จากบริษัท bioM'erieux Vitek, Inc.U.S.A.

หลักการ

ใช้ยูริเคส (uricase) ไปย่อยยูริคดังปฏิกิริยา

Uric acid + $2H_20 + O_2 \xrightarrow{\text{uricase}}$ allantoin+CO_2+ H_2O_2 + 3,5dichloro-2-hydroxybenzene-sulfonic acid + 4-aminoantipyrine $\xrightarrow{\text{peroxidase}}$ chromogen + HCl + $2H_2O$

สารเคมี

1) Reagent 1 (standard) uric acid 476 umol/l (80 mg/l)

2) Reagent 2 (chromogen buffer)

tris buffer pH 8	50 mmol/l
3,5 dichloro-2-hydroxybenzene sulfonic acid	2 mmol/l

surface-active agent 2 mmol/l

3) Reagent 3 (Enzymes)

uricase ≥ 100 U/l

peroxidase ≥ 200 U/l

ascorbate oxidase ≥ 1000 U/l

4-aminoantipyrine 0.25 mmol/l

น้ำยาทั้งหมดควรใช้ก่อนวันหมดอายุ และเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4) น้ำยามาตราฐาน

Reagent 1

5) ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสม่า

นำซีรั่มหรือพลาสม่าที่เก็บได้มาใส่ในสารกันการแข็งตัว EDTA หรือ heparin

วิธีทำ

Working solution :

เติม Reagent 2 ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ลงในขวด Reagent 3

เก็บให้พ้นแสงสามารถใช้ได้นาน 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส และ 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 9 ตารางการเตรียมสารการหาปริมาณ uric acid

สาร	Reagent Blank	Standard	Sample
Reagent 1 (standard)	-	20 ul	-
Sample	-	-	20 ul
Working solution	1 ml	1 ml	1 ml
ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หรือ 20-25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ในช่วงเวลา 30 นาที ใช้ช่วงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (510-530 นาโนเมตร, Hg 546) โดยใส่ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้ reagent blank เป็น zero adjustment			

9.4 การหาปริมาณ total cholesterol ในเลือด

น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ total cholesterol (Kit : Cholest'erol RTU) Enzymatic determination of total cholesterol จากบริษัท bioM'erieux Vitek, Inc.U.S.A.

หลักการ

การเกิดสีของ cholesterol กับน้ำยา

การใช้เอ็นซัยม์

$$\text{cholesterol ester} \xrightarrow{\text{cholesterol esterase}} \text{cholesterol} + \text{fatty acid}$$

$$\text{cholesterol} \xrightarrow{\text{cholesterol oxidase}} \text{cholesten-4, one-3} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{phenol} + \text{amino-4 antipyrine} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{quinoneimine} + 4H_2O$$

cholesterol เมื่อถูก cholesterol oxidase ทำปฏิกิริยาจะให้ choletenone กับ peroxide ซึ่งอาจจะหาได้โดยวิธีต่าง ๆ กัน และใช้ H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับ phenol และ 4 aminoantipyrine โดยมีเปอร์ออกซิเดสช่วยเร่งปฏิกิริยาได้สารเชิงซ้อนสีแดง ต่อมาก็มีการใช้ cholesterol ester hydrolase ร่วมกับ cholesterol oxidase เป็นการหา total cholesterol ส่วนวิธีทำให้เกิดสีกับฮัยโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็มีผู้ดัดแปลงใช้ hydrobenzoate กับ 4 aminophenazone ทำให้เกิด quinone complex สีแดงและเป็นปฏิภาคกับความเข้มข้นของ cholesterol

สารเคมี

1. MOPS buffer pH 7	20 mmol/l
2. phenol	15 mmol/l
3. sodium cholate	3.7 mmol/l
4. magnesium chloride	20 mmol/l
5. surface-active agent	$\geq$ 0.1 %
6. amino-4-antipyrine	0.5 mmol/l
7. peroxidase	$\geq$ 1000 U/l
8. cholesterol oxidase	$\geq$ 200 U/l
9. cholesterol esterase	$\geq$ 125 U/l

น้ำยาทั้งหมดห้ามแช่แข็ง ควรใช้ก่อนวันหมดอายุ และเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

10. น้ำยา cholesterol มาตราฐาน

Calimat ref. 62 321 หรือ Cholest'erol calibrateur 5.17 mmol/l (2 g/l) Ref. 62 473

11. ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสม่า

นำซีรั่มหรือพลาสม่าที่เก็บได้มาใส่ในสารกันการแข็งตัว EDTA หรือ heparin

วิธีทำ

Reagent : พร้อมนำไปใช้เมื่อเปิดแล้วสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 8 สัปดาห์ ที่ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 10 ตารางการเตรียมสารการหาปริมาณ total cholesterol

สาร	Reagent blank	Standard	Sample
Standard	-	1 ul	-
Sample	-	-	10 ul
Reagent	1ml	1 ml	1 ml
ผสมให้เข้ากัน หลังจาก incubate : - 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หรือ - 20-25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ใช้ช่วงความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (492-550) ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้ reagent blank เป็น zero adjustment			

9.5 การหาปริมาณ triglyceride

น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ triglycerides (Kit : Triglyce'rides Enzymatique PAP 150) Enzymatic determination of triglycerides จากบริษัท bioM'erieux Vitek, Inc.U.S.A.

หลักการ

ใช้ เอ็นซัยม์ ดังปฏิกิริยา

Triglycerides $\xrightarrow{\text{lipase}}$ glycerol + fatty acids

Glycerol + ATP $\xrightarrow{\text{glycerol kinase}}$ glycerol-3-phosphate + ADP

Glyderol-3-phosphate $\xrightarrow{\text{glycerol-3-phosphate oxidase}}$ dihydroxyacetonephosphate + H_2O_2

$2H_2O_2$ + parachlorophenol + 4-amino antipyrine $\xrightarrow{\text{peroxidase}}$ quinoneimine+4 H_2O

โดยทำปฏิกิริยา sponiffication Triglycerides จะได้ glycerols และ glycerols นี้จะถูก phosphorylate โดย ATP (in the presence of ATP regenerating system) ทำให้ได้ H_2O_2 ซึ่งถูกรีดิวซ์ โดย peroxidase ทำให้ได้ H_2O นี้จะมีความสัมพันธุ์กับ triglycerides

สารเคมี

1. Reagent 1 (standard) glycerol 2.29 mmol/l (200 mg/100ml-2g/l)

2. Reagent 2 (buffer)

Tris buffer pH 7.6	100 mmol/l
parachlorophenol	2.7 mmol/l
magnesium	4 mmol/l

3. Reagent 3 (Enzymes)

amino-antipyrine	0.4 mmol/l
lipase	≥ 1000 U/l
glycerokinase	≥ 200 U/l
glycerol-3-phosphate oxidase	≥ 2000 U/l
peroxidase	≥ 200 U/l
ATP	0.8 mmol/l

น้ำยาทั้งหมดควรใช้ก่อนวันหมดอายุ และเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4. ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสม่า

นำซีรั่มหรือพลาสม่าที่เก็บได้มาใส่ในสารกันการแข็งตัว EDTA, heparin, sodium, fluoride, oxalate และ citrate

<u>วิธีทำ</u>

Working solution :

เติม Reagent 2 ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ลงในขวด Reagent 3 เขย่าเบา ๆ สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 5 วัน ที่ อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส และ 4 สัปดาห์ ที่ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 11 ตารางการเตรียมสารการหาปริมาณ triglyceride

สาร	Reagent blank	Standard	Sample
Standard (Reagent 1)	-	10 ul	-
Sample	-	-	10 ul
Working solution	1ml	1 ml	1 ml
ผสมให้เข้ากัน หลังจาก incubate : - 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หรือ - 20-25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ใช้ช่วงความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร (492-550) ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้ reagent blank เป็น zero adjustment			

9.6 การหาปริมาณ alkaline phosphatase

น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ alkaline phosphatase activity (Kit : Enzyline® PAL standardise' 50) Kinetic determination of alkaline phosphatase activity (SFBC/SSCC-SGKC/NVCK) จากบริษัทbioM'erieux Vitek, Inc.U.S.A.

หลักการ

เอ็นซัยม์จะ hydrolyse p-notrophenyl phosphate ทำให้เกิดฟอสเฟตกับ p-nitrophenol แล้วคำนวณค่า p-nitrophenol ที่ถูกปล่อยออกมาดังปฏิกิริยา

Nitro-4 phenylphosphate $\xrightarrow{ALP}$ nitro-4 phenol + phosphate

ALP = alkalinephosphatase

โดยปฏิกิริยาที่เกิดใน amino-2 methyl-2 propanol-1 buffer pH 10.5

สารเคมี

1) Reagent 1 (magnesium buffer)

amino-2 methyl-2 propanol-1 buffer pH 10.5	0.9 mol/l
magnesium salfate	1 mmol/l

2) Reagent 2 (substrate)

nitro-4 phenylphosphate	16 mmol/l

น้ำยาทั้งหมดควรใช้ก่อนวันหมดอายุ และเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

3) ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสม่า

นำซีรั่มหรือพลาสม่าที่เก็บได้มาใส่ในสารกันการแข็งตัว EDTA หรือ heparin

วิธีทำ

1. serum start

เติม Reagent 2 ลงในขวด Reagent 1 ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา

สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส และ 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ตารางการเตรียมสาร serum start การหารปริมาณ alkaline phosphatase

ปิเปตสารลงในหลอดทดลองหรือ cuvette ที่ 30 องศาเซลเซียส ดังนี้	
Working solution	3 ml
Sample	0.1ml
ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ที่เพิ่มขึ้นต่อ จากนาทีที่ 1-3 ใช้ช่วงความยาวคลื่น 405 หรือ 410 นาโนเมตร ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้อากาศหรือน้ำกลั่นเป็น zero adjustment	

2. substrate start

Substrate (R1+R2) เติม Reagent 2 จำนวน 1 vial ลงใน Reagent 1 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา

สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส และ 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 13 ตารางการเตรียมสาร substrate start การหาปริมาณ alkaline phosphatase

ปิเปตสารลงในหลอดทดลองหรือ cuvette ที่ 30 องศาเซลเซียส ดังนี้	
Reagent 1	2.5 ml
Sample	0.1ml
ผสม	
Substrate (R1+R2)	0.4 ml
ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ที่เพิ่มขึ้นต่อ จากนาทีที่ 1-3 ใช้ช่วงความยาวคลื่น 405-410 นาโนเมตร ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้อากาศหรือน้ำกลั่นเป็น zero adjustment	

9.7 <u>การหาปริมาณ serum glutamic pyruvic acid transminase (alanine aminotransferase , SGPT)</u>

น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ alanine aminotransferase activity (Kit : Enzyline® ALAT/GPT 20 monore'actit, Enzyline® ALAT/GPT 50 monore'actit) Kinetic determination of alanine aminotransferase activity จากบริษัท bioM'erieux Vitek, Inc.U.S.A.

หลักการ

เอ็นซัยม์จะถูก saturate ด้วย pyridoxal phosphate ก่อนจะวัดหาค่า activity ในระยะ preincubation นี้ความเข้มข้นของ pyridoxal phosphate ดังปฏิกิริยา

L-alanine + α-ketoglutarate $\xrightleftharpoons{GPT}$ pyruvate + L-glutamate

pyruvate + NADH + H^+ $\xrightleftharpoons{LDH}$ L-lactate + NAD^+

GPT = glutamate pyruvate transaminase

LDH = lactate dehydrogenase

สารเคมี

1) Reagent 1 (L-alanine)

Tris buffer pH 7.5	100 mmol/l
L-alanine	500 mmol/l

2) agent 2 (enzyme-coenzyme

α-ketoglutarate	15 mmol/l
NADH	0.18 mmol/l
LDH	$\geq$ 1200 U/l

น้ำยาทั้งหมดควรใช้ก่อนวันหมดอายุ และเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

3) ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสม่า

นำซีรั่มหรือพลาสม่าที่เก็บได้มาใส่ในสารกันการแข็งตัว EDTA หรือ heparin ถ้าเม็ดเลือดแดงแตกจะรบกวนปฏิกิริยา

วิธีทำ

เติม Reagent 2 1 vial

- Enzyline® 20 ลงใน Reagent 1 20 มิลลิลิตร
- Enzyline® 50 ลงใน Reagent 1 1 vial ผสมให้เข้ากัน

สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส และ 4 สัปดาห์ ที่ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 14 ตารางการเตรียมสารการหาปริมาณ serum glutamic pyruvatic acid transminase

ปิเปตสารลงในหลอดทดลองหรือ cuvette ที่ 25, 30 or 37 องศาเซลเซียส ดังนี้	
Reconstituted Reagent 2	1 ml
Sample	100 ul
ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ที่เพิ่มขึ้นต่อ จากนาทีที่ 1-3 ใช้ช่วงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Hg 344-365) ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้อากาศหรือน้ำกลั่นเป็น zero adjustment	

9.8 <u>การหาปริมาณ serum glutamic oxaloacetic acid transminase (aspartate transferase ,SGOT)</u>

น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ aspartate transferase activity (Kit : Enzyline® ASPT/GOT 20 monore'actit, Enzyline® ASPT/GOT 50 monore'actit) Kinetic determination of aspartate transferase activity จากบริษัท bioM'erieux Vitek, Inc.U.S.A.

<u>หลักการ</u>

เอ็นซัยม์จะถูก saturate ด้วย pyridoxal phosphate ก่อนจะวัดหาค่า activity ในระยะ preincubation นี้ความเข้มข้นของ pyridoxal phosphate ดังปฏิกิริยา

$$\text{L-aspartate} + \alpha\text{-ketoglutarate} \xrightleftharpoons{\text{GOT}} \text{pyruvate} + \text{L-glutamate}$$

$$\text{pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{L-lactate} + \text{NAD}^+$$

GOT = glutamate oxalate transaminase

LDH = lactate dehydrogenase

<u>สารเคมี</u>

1) Reagent 1 (L-aspartate)

Tris buffer pH 7.5	100 mmol/l
L-aspartate	500 mmol/l

2) Reagent 2 (enzyme-coenzyme

α-ketoglutarate	15 mmol/l
NADH	0.18 mmol/l
LDH	$\geq$ 1200 U/l

น้ำยาทั้งหมดควรใช้ก่อนวันหมดอายุ และเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3) ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสม่า

นำซีรั่มหรือพลาสม่าที่เก็บได้มาใส่ในสารกันการแข็งตัว EDTA หรือ heparin ถ้าเม็ดเลือดแดงแตกจะรบกวน

วิธีทำ

เติม Reagent 2 จำนวน 1 vial

- Enzyline® 20 ลงใน Reagent 1 20 มิลลิลิตร
- Enzyline® 50 ลงใน Reagent 1 1 viai ผสมให้เข้ากัน

สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส และ 4 สัปดาห์ ที่ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 15 ตารางการเตรียมสารการหาปริมาณ serum glutamic oxaloacetic acid transminase

ปิเปตสารลงในหลอดทดลองหรือ cuvette ที่ 25, 30 or 37 องศาเซลเซียส ดังนี้	
Reconstituted Reagent 2	1 ml
Sample	100 ul
ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ที่เพิ่มขึ้นต่อ จากนาทีที่ 1-3 ใช้ช่วงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Hg 344-365) ใน cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร แสงผ่านได้ ใช้อากาศหรือน้ำกลั่นเป็น zero adjustment	

10. การศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ

สารเคมี

1. 10% buffer formalin
2. 80% Ethanol
3. 95% Ethanol
4. 100% or Absolute ethanol
5. Xylene
6. Paraffin
7. Gelatin
8. Hematoxylin
9. Eosin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

1) Automatic tissue processor
2) Microtome
3) Microtome knife
4) Microtome knife sharpener
5) Hot air oven
6) Tissue floating bath
7) Refrigerator
8) Light microscope
9) Balance
10) PH meter
11) Magnetic stirrer
12) Hot plate

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อ

เมื่อทำการทดลองครบตามแผนการทดลอง นำหนูมาฆ่าเพื่อพิสูจน์ซาก โดยใช้คิโยตินตัดหัว แล้วผ่าเปิดหน้าท้อง นำ ตับ ไต มดลูก และรังไข่ ทั้ง 2 ข้าง ก้อนเนื้อบริเวณเต้านมที่คาดว่าจะเป็นมะเร็ง ในทุกกลุ่มการทดลอง มาทำตามขั้นตอนดังนี้

1) ขั้นตอนการ Fixation

1.1 การ Fixation

นำชิ้นเนื้อดังกล่าวข้างต้น แช่ใน 10% buffer formalin ทันที ชิ้นเนื้อที่มีเลือด หรือของเหลวจากชิ้นเนื้อออกมามาก ๆ ควรถ่าย 10% buffer formalin เก่าทิ้งและใส่ 10% buffer formalin ใหม่แทนที่เพื่อให้การ Fixation มีประสิทธิผลยิ่งขึ้น

1.2 การล้างชิ้นเนื้อภายหลัง Fixation

หลังจาก Formalin fixation นำชิ้นเนื้อที่ได้ไปล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน เป็นเวลา 10-20 นาที

2) ขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อทำ Paraffin block

ตัดชิ้นเนื้อที่ได้จากข้อ 1. ขนาด 1-2 ซม. หนา 1/2 ซม. วางลงในตลับใส่ชิ้นเนื้อ พร้อมเขียนหมายเลขของเนื้อเยื่อ ลงใน ตลับใส่ชิ้นเนื้อ จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปแช่ในสารละลายต่าง ๆ ตามลำดับขั้นดังนี้

2.1 80% Ethanol - 2 ครั้ง - ครั้งละ 1 ชม.

2.2 95% Ethanol	-	3 ครั้ง	-	ครั้งละ 1 ชม.
2.3 100% Ethanol	-	2 ครั้ง	-	ครั้งละ 1 ชม.
2.4 Xylene	-	2 ครั้ง	-	ครั้งละ 1 ชม.
2.5 Paraffin	-	2 ครั้ง	-	ครั้งละ 1 ชม.

2.6 นำไป Embed

เทพาราฟฟินที่หลอมเหลวแล้วใส่ลงในแม่พิมพ์ที่เตรียมไว้แล้ว นำชิ้นเนื้อวางลงในแม่พิมพ์ที่มีพาราฟฟินอยู่ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วค่อยเอาออกจากแม่พิมพ์ได้

3) ขั้นตอนการตัดชิ้นเนื้อพาราฟฟิน (Paraffin section)

3.1 Trimming ใช้ใบมีดโกนหรือมีดบาง ๆ ตัดเอาพาราฟฟินที่อยู่รอบ ๆ ตัวอย่างทั้งสี่ด้านออกไป โดยเฉพาะด้านกว้างซ้าย-ขวา ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า

3.2 Facing นำแม่พิมพ์พาราฟฟินที่ได้จากการ trim แล้ว ใส่ในช่องสำหรับยึดตัวอย่าง (block holder) แล้วปรับหน้าตัดของแม่พิมพ์ให้ด้านยาวขนานกับใบมีดของเครื่อง microtome จึงหมุนสกรูที่ block holder เพื่อยึดแม่พิมพ์ตัวอย่างให้แน่น

3.3 Sectioning ตัดแม่พิมพ์ตัวอย่างด้วย microtome ก่อนจะตัดต้องหมุนปุ่มปรับความหนาของ section ประมาณ 4-7 ไมโครเมตร และปรับมุมของมีดที่กระทำต่อแม่พิมพ์ (clearance angle) ระหว่าง 5-10 องศา

3.4 Picking up section นำเอา section ที่ตัดได้ไปวางไว้บนแผ่นกระจกสไลด์ โดยมีขั้นตอนดังนี้ ลอย section บนผิวน้ำอุ่น (water bath หรือ floatation bath) ปรับอุณหภูมิของน้ำประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ใส่ gelatin ผงลงไปในน้ำอุ่นในหม้อน้ำอุ่น ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5% สารละลาย gelatin จะช่วยให้ section ติดกับแผ่นกระจกสไลด์ กรณีที่ section เป็นแถบยาว ใช้พู่กันหรือ forcep แยก section ออกเป็นแผ่น ๆ เลือกเอาแผ่นที่ดีที่สุด โดยใช้กระจกสไลด์จุ่มลงในน้ำอุ่น เลื่อนกระจกสไลด์ไปแตะติดกับ section โดยให้ด้านข้างของแผ่น section ติดกับผิวหน้าของกระจกสไลด์ จากนั้นค่อยเลื่อนกระจกสไลด์เอียงเป็นมุม 45 องศา ขึ้นจากน้ำอุ่น แผ่น section จะเกาะติดกับกระจกสไลด์ขึ้นมา

3.5 Drying slide ทำให้ section ที่ติดอยู่บนแผ่นกระจกสไลด์แห้ง โดยใส่ในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิไว้ไม่เกินจะหลอมตัวของพาราฟฟิน เมื่อสไลด์เนื้อเยื่อแห้งสนิทแล้ว จึงนำไปย้อมสีได้

3.6 Resealing block ผนึกปิดด้านหน้าของแม่พิมพ์พาราฟฟินภายหลังตัดแล้ว โดยจุ่มผิวหน้าของแม่พิมพ์ลงในพาราฟฟินเหลว จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เก็บแม่พิมพ์

4) ขั้นตอนการย้อมสีทั่วไป

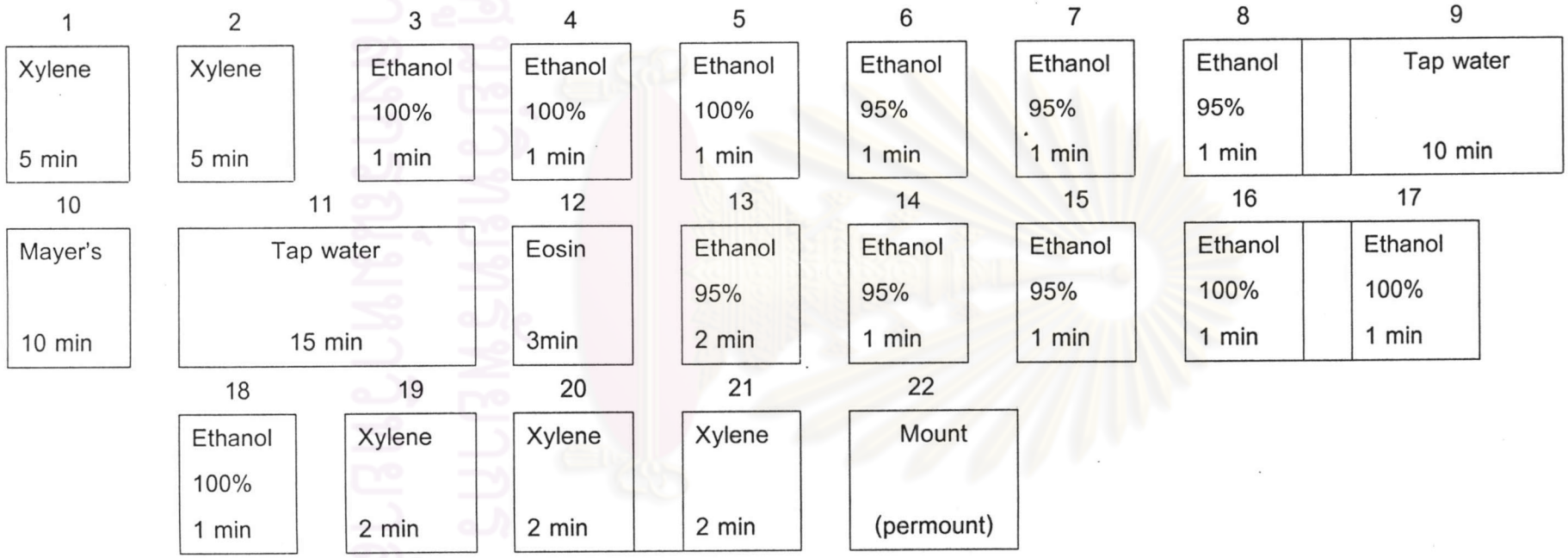
การย้อมสี วิธีที่นำมาใช้คือ Mayer's hematoxylin และ eosin stain การย้อมสีทำตามลำดับขั้นดังนี้

4.1 Xylene	-	2 ครั้ง	-	ครั้งละ 5 นาที
4.2 100% Ethanol	-	3 ครั้ง	-	ครั้งละ 1 นาที
4.3 95% Ethanol	-	3 ครั้ง	-	ครั้งละ 1 นาที
4.4 ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลา				นาน 10 นาที
4.5 ย้อมด้วยสี Mayer's hematoxylin				นาน 10 นาที
4.6 ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลา				นาน 15 นาที
4.7 ย้อมด้วยสี eosin				นาน 3 นาที
4.8 95% Ethanol	-	1 ครั้ง	-	ครั้งละ 2 นาที
4.9 95% Ethanol	-	2 ครั้ง	-	ครั้งละ 1 นาที
4.10 100% Ethanol	-	3 ครั้ง	-	ครั้งละ 1 นาที
4.11 Xylene	-	3 ครั้ง	-	ครั้งละ 2 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผังการย้อมสี

(Mayer's hematoxylin and eosin stain)



5) ขั้นตอนการ Mount

นำสไลด์มา mount ด้วย Canada balsam ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วเก็บใส่ในกล่องเก็บสไลด์ บันทึกผลการทดลองโดยนำสไลด์มาถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

11. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

ในการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ เช่นน้ำหนักตัวหนู น้ำหนักอาหารที่หนูกิน ระดับฮอร์โมน น้ำหนักตับ ไต น้ำหนักและขนาดของมดลูก รังไข่ ค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และค่าทางชีวเคมีคลินิก ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้กวาวเครือขาว ที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้ Unpaired t-test และเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนู น้ำหนักอาหารที่หนูกิน ภายในกลุ่มการทดลองโดยใช้ one way ANOVA และใช้ LSD test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

ในการทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ เช่นน้ำหนักตัวหนู น้ำหนักอาหารที่หนูกิน ระดับฮอร์โมน น้ำหนักตับ ไต น้ำหนักและขนาดของมดลูก รังไข่ ค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และค่าทางชีวเคมีคลินิก ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้กวาวเครือขาว ที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้ Unpaired t-test และเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนู น้ำหนักอาหารที่หนูกิน ภายในกลุ่มการทดลองโดยใช้ one way ANOVA และใช้ LSD test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

ในการทดลองที่ 3 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ เช่น จำนวนหนูที่พบก้อนเนื้อบริเวณเต้านม ช่วงเวลาของการพบ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้กวาวเครือขาวที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้ Chi-square และ น้ำหนักตัว น้ำหนักอาหารที่หนูกิน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนเนื้อบริเวณเต้านม ระดับฮอร์โมน E_2 ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้กวาวเครือขาวที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้ Unpaired t-test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย