หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเก็บรักษาปัสสาวะหญิงมีครรภ์ที่ใช้ในการทดลอง

ทำการทดลองโดยเก็บปัสสาวะตัวอย่างที่สภาวะต่าง ๆ กัน แบ่งปัสสาวะออกเป็น 3 ส่วน เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 4 °ซ. และ -20 ° ซ. โดยไม่ได้เติมไทเมอโรซอล (Thymerosol) สองส่วน อีกหนึ่งส่วนเติมไทเมอโรซอลเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์จำนวน 2-3 หยดแล้วเก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 4° ซ. โดยบรรจุตัวอย่างในหลอดทดลองหลอดละ 3 มล. นำตัวอย่างปัสสาวะมาตรวจหาแอคติวิตีของ HCG ที่ระยะเวลาต่าง ๆ รวม 10 วัน

3.2 การหาแอคติวิตีของ HCG

หาโดยวิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) โดยใช้ชุดตรวจการตั้งครรภ์ของบริษัท Syntron Bioresearch : 2015 รายละเอียดในการตรวจหาแอคติวิตีดังแสดงในภาคผนวกที่ 1

3.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยใช้สีไบโอแรด (Biorad Dye)

วิธีวัดโปรตีนใช้สีไบโอแรดของบริษัท Biorad , USA. รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ 2

3.4 การทำ HCG ให้บริสุทธิ์

นำปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ที่เก็บไว้ในสภาวะที่เหมาะสมมาเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลา 15 นาที นำปัสสาวะซึ่งมีลักษณะใสมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.4.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอลกอฮอล์หรืออะซิโตนใช้วิธีของ Bell และคณะ (1969)

โดยนำปัสสาวะที่ผ่านการกำจัดตะกอนเบื้องต้นมาปรับpHให้เท่ากับ 3.0 ด้วยกรดฟอร์มิคแล้วหยดอะซิโตน หรือ แอลกอฮอล์ ลงในปัสสาวะอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของอะซิโตนเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ (ในกรณีที่ใช้อะซิโตนในการตกตะกอน) และได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 80เปอร์เซนต์ (ในกรณีที่ตกตะกอนโดยใช้แอลกอฮอล์) ควบคุมอุณหภูมิขณะตกตะกอนให้เท่ากับ 4° ซ. กวนต่อไปอีก 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. 1 คืน จากนั้นนำไปเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกรอง วัดปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของ HCG ตามวิธีในข้อ 3.3 และ 3.2 นำสารละลายที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน บรรจุลงในถุงไดอะไลซิส นำไปแช่ในบัฟเฟอร์เอ (ทริสฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 8.3) ปริมาตร 2 ลิตร เปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 3 ชั่วโมง 4 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของ HCG

3.4.2 การทำให้ปัสสาวะเข้มข้นด้วยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่น (ultrafiltration)

นำปัสสาวะที่เก็บไว้มาเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสมากรองผ่านแผ่นใยแก้ว (G.F.C.) เพื่อกำจัดเมือกและส่วนปนเปื้อนที่อาจปะปนมาในปัสสาวะก่อนนำมาผ่านเครื่องอัลตร้าฟิลเตรชั่นที่มีแผ่นกรอง ซึ่งยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตันผ่านออกไปได้ เติมบัฟเฟอร์เอ 4 เท่าของปริมาตรปัสสาวะเริ่มต้นเพื่อกำจัดเกลืออื่น ๆ และแทนที่ด้วยบัฟเฟอร์ จนกระทั่งปัสสาวะมีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 0.6-1.0 มก./มล. จึงเก็บปัสสาวะดังกล่าวไว้ ณ อุณหภูมิ 4 °ซ. เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

019584

3.4.3 การทำ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ 50 (DEAE Sephadex A 50) ดัดแปลงจากวิธีของ Bahl (1969 b)

<u>การเตรียมคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ 50</u>

นำดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ 50 ประมาณ 1 กรัม แช่ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0 ที่มีโปตัสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ 500 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อปล่อยให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ จากนั้นเทส่วนใสและเจลละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง นำเจลที่ได้มาบรรจุลงในคอลัมน์พลาสติก ขนาด 1.0 x 5.0 เซนติเมตร ให้ได้ความสูงประมาณ 4 ใน 5 ส่วนของคอลัมน์ ผ่านสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0 ที่มีโปตัสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ลงในคอลัมน์อย่างน้อย 2-3 เท่าของปริมาตรเจล เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพที่สมดุลย์ วัด pH ของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เพื่อให้แน่ใจว่ามี pH เท่ากับ 7.0

<u>การใช้คอลัมน์เพื่อทำให้ HCG บริสุทธิ์</u>

บรรจุปัสสาวะตัวอย่างที่ผ่านการไดอะไลซ์ปริมาตร 10 มล. ลงในคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เอ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. ติดต่อกันจนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วยบัฟเฟอร์เอที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ต่อไปอีกจนกระทั่งไม่พบโปรตีนออกจากคอลัมน์ นำสารละลายหลอดเว้นหลอดมาตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วยสีไบโอแรดและวัดแอคติวิตีของ HCG นำหลอดที่มีแอคติวิตีของ HCG มารวมกัน ไดอะไลส์ตามวิธีข้อ 3.4.1 และวัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของ HCG

3.4.4 การทำ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง (High Performance Liquid Chromotography)

ในการทำให้ HCG บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้ได้ใช้คอลัมน์ชนิดพีเอ-ดีอีเออี (PA-DEAE) ก่อนการใช้คอลัมน์ทุกครั้งต้องผ่านบัฟเฟอร์เอเข้าไปในคอลัมน์จนกระทั่งแน่ใจว่าคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์และมี pH เท่ากับ 8.3 ในการทำ HCG ให้บริสุทธิ์มีการแปรสภาวะในการ

ชะ 4 แบบดังนี้

ก. การชะแบบที่ใช้เกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 0-1.0 โมลาร์ในบัฟเฟอร์เอ ในเวลา 40 หรือ 50 นาที ทำโดยฉีดสารละลาย HCG ที่ได้จากข้อ 3.4.3 เข้าไปในคอลัมน์ ชะด้วยบัฟเฟอร์เอจนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ จากนั้นชะโปรตีนที่ยึดกับพีเอ-ดีอีเออีในคอลัมน์โดยใช้เกรเดียนท์เส้นตรงที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 -1.0 โมลาร์ ในเวลา 40 หรือ 50 นาที เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. นำสารละลายหลอดเว้นหลอดมาตรวจหาโปรตีนและวัดแอคติวิตีของ HCG นำหลอดที่มีแอคติวิตีของ HCG มารวมกัน และทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นโดยใช้วิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่น วัดปริมาตรปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของ HCG จากนั้นแบ่งสารละลาย HCG ที่ได้ใส่หลอดแก้วหลอดละ 2-3 มล. ไลโอฟิไลส์แล้วเก็บ HCG ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -70 ° ซ.

ข.ทำเช่นเดียวกับข้อ ก.แต่ใช้ปัสสาวะที่ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่นดังข้อ 3.4.2 และชะโปรตีนแบบเกรเดียนท์เส้นตรงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 0-0.6 โมลาร์ในบัฟเฟอร์เอ ในเวลา 90 นาที เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล.

ค. ทำเช่นเดียวกับข้อ ก. แต่ใช้ปัสสาวะหญิงมีครรภ์ที่ทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่น ดังข้อ 3.4.2 และชะโปรตีนด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.12 โมลาร์ในบัฟเฟอร์เอ เป็นเวลา 90 นาที เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล.

ง. ทำเช่นเดียวกับข้อ ก. แต่ใช้ปัสสาวะหญิงมีครรภ์ที่ทำให้เข้มข้นด้วย วิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่น ดังข้อ 3.4.2 และชะโปรตีนด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.06 โมลาร์ในบัฟเฟอร์เอ เป็นเวลา 90 นาที เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล.

3.5 การศึกษาสมบัติบางประการของ HCG

การหาน้ำหนักโมเลกุลของ HCG โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)ใช้วิธี Laemmli (1970)

การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น

เตรียมสารละลาย resolving gel โดยผสมสารละลาย ทรีส-เอสดีเอส บัฟเฟอร์ pH 8.8 ปริมาตร 30 มล. สารละลายอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซนต์ 19.8 มล. TEMED 15 ไมโครลิตรสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซนต์ 1.5 มล. เติมน้ำกลั่นให้สารละลายทั้งหมดมีปริมาตรเจล 60 มล. เตรียมสารละลาย Stacking gel โดยผสมสารละลายทรีส-เอสดีเอสบัฟเฟอร์ pH 6.8 10 มล. สารละลายอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซนต์ 2 มล. TEMED 10 ไมโครลิตร สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซนต์ 1 มล. เติมน้ำกลั่นให้สารละลายทั้งหมดมีปริมาตร 20 มล. นำสารละลายส่วน Resolving gel ใส่ลงในแม่พิมพ์อย่างช้า ๆ โดยระมัดระวังมิให้เกิดฟองแก๊ส ให้มีความสูงประมาณ 11 ซม. และปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่น รอจนกระทั่งเจลแข็งตัว เทน้ำทิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นใส่สารละลายส่วน Stacking gel และแม่พิมพ์ช่องเจล (comb) ปล่อยให้แข็งตัวภายใต้แสงฟลูออร์เรสเซนต์ 30 นาที ล้างส่วนของเจลที่ไม่แข็งตัวออกด้วยน้ำกลั่น

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ Rabbit muscle phosporylase b, Bovine serum albumin, Hen egg white ovalbumin, Bovine carbonic anhydase, Soybean trypsin ,Hen egg white ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 97,400 66,200 45,000 31,000 21,500 และ 14,400 ดาลตัน ตามลำดับ

การเตรียม HCG ที่ต้องการวิเคราะห์

ผสม HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.4.4 ง ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 มก./มล. ในหลอดพลาสติคขนาดเล็ก เติมสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (Sample buffer) 10 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที

ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปหยอดลงในช่อง (well) ของเจล ช่องละประมาณ 20 ไมโครลิตร

การทำอิเลคโตรโฟรีซิส

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ที่มีสารละลายทรีส -เอสดีเอสไกลซีน pH 8.3 อุณหภูมิ 15°ซ. (ปรับอุณหภูมิของอ่างให้ได้ 15 °ซ.ก่อนการทดลอง) เติมบัฟเฟอร์ลงในอ่างบนให้ได้ระดับจากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 20 มิลลิแอมแปร์/เจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน จนกระทั่งแถบสีโบรโมฟีนอล บลู (Bromophenol blue) ซึ่งใช้ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนเคลื่อนลงไปจนถึงระยะอีก 1 ซ.ม. จากปลายล่างของแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

วิธีย้อมสีโปรตีนในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล

แกะเจลจากแผ่นกระจก ตรึงโปรตีนที่แยกได้ให้ติดกับเจลโดยกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เป็นเวลา ครึ่งชั่วโมง จากนั้นจึงย้อมสีของโปรตีนด้วยสารละลายโคแมสซีบริลเลียนท์ บลู จี 250 (comassie brilliant blue G 250) ทิ้งไว้ 1 คืน นำเจลไปแช่ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก:เมทานอล:น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2:17 จนกระทั่งได้พื้นเจลใส และปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนบนเจล

3.6 การผลิตแอนติบอดี

3.6.1 การเตรียม HCG และการฉีดเข้ากระต่าย

ละลาย HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และเก็บไว้ดังข้อ 3.4.4 ด้วย 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ให้มีปริมาตรน้อยที่สุด นำไปผสมกับ Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ใช้เครื่องเขย่า (Vortex mixer) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและให้ได้ของเหลวมีลักษณะหนืด จากนั้นนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่าย (Intradermal injection) ณ บริเวณหลังที่โกนขนไว้แล้ว โดยจับผิวหนังกระต่ายบริเวณหลังให้นูนขึ้นมาเล็กน้อย แทงเข็มบริเวณผิวกระยะให้อยู่ระหว่างผิวหนังกำพร้ากับหนังแท้ ฉีดสารละลายช้า ๆ จุดละ

0.2 มล. (ควรเห็นผิวหนังโป่งพองและสารละลายสีขาวใต้ผิวหนัง) แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว

ในการทดลองได้แบ่งกระต่ายออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว โดยกลุ่มแรกฉีด HCG 1,000 IU และกลุ่มที่ 2 ฉีด 2,000 IU และฉีดซ้ำ (booster injection) ในสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 15 หลังการฉีดครั้งแรก

ก่อนการฉีด Booster ทุกครั้งจะทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่หูกระต่ายมาตรวจวัดระดับแอนติบอดี

3.6.2 การเจาะเลือดและการเก็บรักษาซีรัมเพื่อตรวจวัดแอนติบอดี

นำกระต่ายวางลงในกล่องสำหรับเจาะเลือด ใช้สำลีชุบไซลีน (Xylene) ทาบริเวณหูกระต่ายเล็กน้อยเพื่อให้หลอดเลือดดำขยายตัว เจาะเส้นเลือดดำด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 21 และกระบอกฉีดยาทำด้วยแก้วขนาด 10 มล. และนำมาใส่ในขวดรูปชมพู่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ช.ม.แล้วทิ้งค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 ° ซ. ดูดเอาส่วนของซีรั่มออกใส่ในหลอดเหวี่ยง จากนั้นนำมาเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเม็ดเลือดแดงออก เก็บส่วนใสคือซีรั่มใส่หลอดขนาดเล็ก ๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ. เพื่อตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธีดังข้อ 3.7

3.7 การหาปริมาณแอนติบอดีต่อ HCG โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ELISA)

เตรียมสารละลาย HCG (Iodination Grade) ใน PBS (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์)pH 8.3 ให้มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมล. ใส่ลงในหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท (Microtiter plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 1 คืน ล้าง HCG ที่มากเกินพอด้วย PBS pH 8.3 จำนวน 300 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมแอนติบอดีต่อ HCG ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 ในอัตราส่วนต่างๆ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีที่เหลือออกด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 เติม Goat-antirabbit

IgG-alkaline phosphatase conjugate ซึ่งเจือจางด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 ในอัตราส่วน 1:5000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง Goat-antirabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate ที่เหลืออกด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 เติมซับสเทรต OPD (1,2-Phenylene diamine dihydrochloride) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมตัวเร่งปฏิกิริยา (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีในที่มืด แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านเพลต(Plate Reader) แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรและความเจือจางของแอนติบอดีต่อ HCG ระดับแอนติบอดีที่วัดได้จะแสดงเป็นค่าไตเตอร์ (titer) โดยการคำนวณว่าไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรั่มคือความเจือจาง (เป็นจำนวนเท่า)ของแอนติบอดีต่อ HCG ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรสูงกว่าของค่า baseline เท่ากับ 0.5

3.8 <u>การทำให้แอนติบอดีต่อ HCG บริสุทธิ์</u>

3.8.1 <u>การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u>

เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวทีละน้อยลงในซีรั่มกระต่าย (จากข้อ 3.6.2) พร้อมทั้งกวนเบา ๆ จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 เปอร์เซนต์ของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว หลังจากนั้นกวนต่อไปอีก 2 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวอีกจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 65 เปอร์เซนต์และ 70 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ทิ้งไว้ให้โปรตีนตกตะกอนและแยกตะกอนตามวิธีดังกล่าวข้างบน ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 วัดปริมาตรสารละลายแบ่งไว้ส่วนหนึ่งเพื่อหาปริมาณโปรตีนและปริมาณแอนติบอดี นำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลส์ใน PBS pH 8.3 เปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 3 ชม. 4 ครั้ง หลังจากนั้นนำสาร

ละลายที่ได้มาวัดปริมาตรหาปริมาณโปรตีนและปริมาณแอนติบอดี

3.8.2 <u>การทำ แอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ(Affinity chromatography)</u> ทำตามวิธีของ Cuatrecasas(1970)

แช่เซฟาโรส 4 บี (Sepharose 4 B) 1 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริก 0.001 โมลาร์เป็นเวลา 15 นาที กรองแยกเซฟาโรส 4 บี ออกแล้ว นำมาล้างด้วยไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1โมลาร์ 3 ครั้ง จากนั้นเติม HCG ที่มีความเข้มข้น 1 มก./มล. จำนวน 5 มล. ลงในเซฟาโรส 4 บี เขย่าเบา ๆ 2 ช.ม. ที่อุณหภูมิห้อง กรอง แยก HCG ส่วนเกินออก ล้าง 3 ครั้ง ด้วยไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.3 เติมเอธาโนลามีน (Ethanolamine) 5 มล. เพื่อกันการเกิดปฏิกิริยา เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ช.ม. แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์พลาสติกขนาด 10 มล. ล้างคอลัมน์ด้วยไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.3 เพื่อกำจัดเอธาโนลามีนส่วนเกิน เติมอะซิเตดบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 4.0 ลงในคอลัมน์ 5 มล. ล้างคอลัมน์ด้วยไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจลเพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุล

นำแอนติบอดีที่ได้จากข้อ 3.8.1 ปริมาตร 0.1 มล. ผสมรวมกับไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ในปริมาตรเท่า ๆ กัน เทสารละลายลงในคอลัมน์และให้ของเหลวออกจากคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหล 10 มล./ช.ม. ชะออกด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ pH 2.0 ซึ่งมีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ผสมอยู่ ด้วยอัตราการไหล 10 มล./ชม.เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ครั้งละ 0.5 มล. ลงในหลอดที่มีทริสไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ pH 8.3 ในปริมาตรที่เท่ากันเพื่อรักษาสภาพของแอนติบอดี

3.8.3 <u>การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีต่อ HCG ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิส (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)</u> ใช้วิธี Davis (1964)

<u>การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น</u>

เตรียมสารละลาย Resolving gel โดยผสมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์

pH 8.9 ปริมาตร 5 มล. สารละลายอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซนต์ 10 มล. น้ำกลั่น 25 มล. และสารละลาย 1 % แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 300 ไมโครลิตร TEMED 150 ไมโครลิตร และเตรียมสารละลาย Stacking gel โดยผสมสารละลายทรีสไฮโดรคลอไรด์ pH 6.7 ปริมาตร 2.5 มล. สารละลายอะคริลาไมด์ 5มล. น้ำกลั่น 10 มล. และ สารละลายไรโบเฟวิน 2.5 มล. TEMED 100 ไมโครลิตร นำสารละลายทั้ง 2 ส่วนกำจัดฟองแก๊สก่อนนำไปใส่ในแม่พิมพ์เจล นำสารละลายส่วน Resolving gel ใส่ลงในแม่พิมพ์อย่างช้า ๆ โดยระมัดระวังมิให้เกิดฟองแก๊ส ให้มีความสูงประมาณ 11 ซม. และปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่น รอจนกระทั่งเจลแข็งตัว เทน้ำทิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นใส่สารละลายส่วน Stacking gel และแม่พิมพ์ช่องเจล ส่องไฟเพื่อกระตุ้นให้เจลแข็งตัวและทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที ล้างส่วนของเจลที่ไม่แข็งตัวออกด้วยน้ำกลั่น

นำซีรั่มและแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.8.1,3.8.2 และซีรัมที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีน เอ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในหลอดพลาสติกขนาดเล็กให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 5 มก./มล. นำไปหยอดลงในช่องเจลช่องละประมาณ 20 ไมโครลิตร

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ที่มีสารละลายทรีส -ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 อุณหภูมิ 10 °ซ. เติมบัฟเฟอร์ลงในอ่างบนให้ได้ระดับ จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 20 มิลลิแอมแปร์/เจลโดยกำหนดให้ช้ำลบอยู่ด้านบน จนกระทั่งแถบสีโบรโมฟีนอลบลู ซึ่งใช้ติดตามเคลื่อนไปจนระยะอีก 1 ซ.ม. จากปลายแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

แกะเจลจากแผ่นกระจก ตรึงโปรตีนที่อยู่ในเจลโดยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นแช่เจลในสารละลายโคแมสซีบริลเลียนท์ บลู จี 250 ทิ้งไว้ 1 คืน นำเจลไปแช่ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน จนกระทั่งได้เจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนบนเจล (Destaining solution) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก : เมทานอล : น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2:17

3.9 การศึกษาสมบัติบางประการของแอนติบอดีต่อ HCG

การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีต่อ HCG ใช้วิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 3.8.3

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ Phosphorylase b, BSA, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, และ Soybean trypsin inhibitor ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 94,000, 67,000, 43,000, 30,000, 20,100 ดาลตัน ตามลำดับ

ละลายแอนติบอดีต่อ HCG ที่ได้จากข้อ 3.8.2 ด้วยน้ำกลั่นแล้วทำการแยกและย้อมสีโปรตีนด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวแล้วในข้อ 3.5

3.10 การตรวจสอบความจำเพาะระหว่าง HCG และแอนติบอดีต่อ HCG

3.10.1 วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

ต้มอะกาโรส (1%) ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปตอากาโรสปริมาตร 3 มล. ปล่อยลงบนแผ่นสไลด์ ขนาด 2.5 x 7.5 ซ.ม. รอจนกระทั่งอากาโรสแข็งใช้เวลาประมาณ 5 นาที ใช้แม่พิมพ์กดให้เป็นรอย นำ HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการดังข้อ 3.4.4 ง ซึ่งมีความเข้มข้น 20 IU/ml และ HCG มาตรฐาน (ของบริษัท Sigma chemical) ความเข้มข้น 25 IU/ml มาหยดลงบนแผ่นสไลด์ตามรอยแม่พิมพ์อย่างละ 3 หลุม และหยด HCG-Ab ลงที่หลุมตรงกลางหลุมละ 10 ไมโครลิตร เก็บแผ่นสไลด์ไว้ในกล่องที่มีความชื้น ตรวจสอบผลภายหลังตั้งเจลทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลที่ได้มาทำให้แห้ง ย้อมสีโดยนำแผ่นสไลด์ที่ได้มาล้างโปรตีนส่วนเกินออกโดยแช่ไว้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซนต์ 3 ครั้งครั้งละ 15 นาที และแช่ในน้ำกลั่น 15 นาที นำแผ่นสไลด์ที่ได้ ปิดทับด้วยกระดาษซับที่ชื้น ใช้กระจกหรือหนังสือทับลงบนแผ่นสไลด์ 15 นาที จากนั้นทิ้งแผ่นสไลด์เพื่อปล่อยให้แห้งเป็นเวลาประมาณ 12 ช.ม. แผ่นสไลด์ที่แห้งแล้วนำมาย้อมสีโคแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ กำจัดสีส่วนเกินด้วยน้ำยาซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก :น้ำ :เมทานอล ในอัตราส่วน 1:6:3 จนกระทั่งพื้นเจลใสและเห็นแถบของโปรตีนปรากฏอยู่

3.10.2 วิธีอิมมูโนอิเลคโตรโฟรีซิส

ต้มอะกาโรส (1%) ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปตอากาโรสปริมาตร 12 มล. ปล่อยลงบนแผ่นสไลด์ขนาด 7.5 x7.5 ซ.ม. รอจนกระทั่งอากาโรสแข็ง (ใช้เวลาประมาณ 5 นาที) ใช้แม่พิมพ์กดให้เป็นรอยและดูดเจลออก และใช้มีดกรีดตามรอยยาวของแม่พิมพ์ และใช้ปลายมีดตัดหัวท้ายดึงเจลออกจากรอยยาวซึ่งจะได้แผ่นเจลที่มีร่องและหลุมสลับกัน นำสารละลายตัวอย่างหยอดลงในหลุมจำนวน 10 ไมโครลิตร

หลุมที่ 1 HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการข้อ 3.4.4 ง

หลุมที่ 2 และ 3 HCG มาตรฐานของบริษัท Sigma

นำแผ่นสไลด์วางลงตรงกลางของเครื่องอิมมูโนอิเลคโตรโฟรีซีส เทสารละลายบาบิทอลบัฟเฟอร์ pH 8.6 ลงในช่องทางด้านข้างของเครื่องมือ ทั้ง 2 ข้าง ใช้กระดาษซับซึ่งเปียกชุ่มด้วยบัฟเฟอร์เป็นสะพานไฟ โดยวางให้ด้านหนึ่งจุ่มในบัฟเฟอร์ ปลายอีกด้านหนึ่งแตะกับแผ่นสไลด์ ต่อขั้วอิเลคโตรดให้เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า เปิดเครื่องโดยให้มีค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ 400 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงจึงยกเจลออกจากเครื่อง จากนั้นใส่แอนติบอดีต่อ HCG จำนวน 1 มล. ลงในช่องซึ่งใช้ใบมีดกรีดไว้ เก็บสไลด์ไว้ในกล่องซึ่งมีความชื้น ตรวจผลภายหลังทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง ทำการล้างสไลด์และย้อมสีเช่นเดียวกับข้อ 3.10.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย