

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. ประชากรที่ทำการศึกษา

1.1 กลุ่มประชากรที่ศึกษา เป็นเด็กแรกคลอดเพศชาย จำนวน 51 ราย เกิดจากบิดา มารดาที่มีพื้นภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และปัจจุบันอาศัยอยู่ในภูมิลำเนาเดิมโดยมาคลอดที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น

1.2 กลุ่มประชากรเปรียบเทียบ เป็นเด็กแรกคลอดเพศชาย จำนวน 41 ราย เกิดจากบิดา มารดาที่มีพื้นภูมิลำเนาเป็นคนภาคกลาง และปัจจุบันอาศัยอยู่ในกรุงเทพมหานคร หรือเขตปริมณฑลใกล้เคียง โดยมาคลอดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร

2. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากรกของเด็กแรกคลอด (cord blood) คนละประมาณ 30 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปากกว้างที่ได้ใส่เฮปาริน (heparin) ซึ่งเป็นสารกันเลือดแข็งไว้แล้ว ในอัตราส่วน เฮปาริน 8-10 ยูนิตต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เขย่าขวดเล็กน้อย แล้วนำมาทำการทดลองทันที

3. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

บริษัทที่ผลิตชื่อสารเคมี

Sigma Chemical

1. Histopaque R - 1077
2. Histopaque R - 1119
3. adenosine triphosphate (ATP)
4. Trizma base
5. ethylene glycol-bis (aminoethyl ether) NNNN-tetra acetic acid (EGTA)
6. N-Z-hydroxy ethyl piperazine-N-Z-ethane sulfonic acid (CHEPES)
7. histidine
8. sodium dodecyl sulfate (SDS)
9. triton-X-100
10. folin reagent
11. bovine serum albumin (BSA)

Amersham

1. [3H] ouabain

E Merck

1. trichloroacetic acid (TCA)
2. sodium chloride (NaCl)
3. sodium hydroxide (NaOH)
4. magnesium chloride ($MgCl_2$)
5. potassium chloride (KCl)

บริษัทที่ผลิตชื่อสารเคมี

6. stannous chloride (SnCl_2)
7. hydrazine sulfate
8. ammonium molybdate
9. toluene
10. 2,5-diphenyl-oxazole (PPO)
11. dimethyl POPOP

Kodak

1. coomanie Brilliant Blue G-250

Seromed

1. powdered medium 199 with
EARLE's salts formula No.
T 061-1

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้ชื่ออุปกรณ์บริษัทที่ผลิต

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. spechophotometer | Shimadzu, Japan |
| 2. water bath | Gelman Science, USA. |
| 3. refrigerated centrifuge | Tomy, Japan |
| 4. refrigerated centrifuge | Sorvoll, USA. |
| 5. balance | Shimadzu, Japan |
| 6. vortex mixer | Model Genie II, USA. |
| 7. %-counter | LKB Wallac, Finland |
| 8. hemocytometer | Counting chamber, AO, USA. |

<u>ชื่ออุปกรณ์</u>	<u>บริษัทที่ผลิต</u>
9. PH meter	Orion pH meter
10. light microscope	Olympus, Japan
11. flame photometer	Corning ,USA
12. pipette ขนาดต่าง ๆ	
13. tubes and centrifuge tubes	

5. วิธีการศึกษา

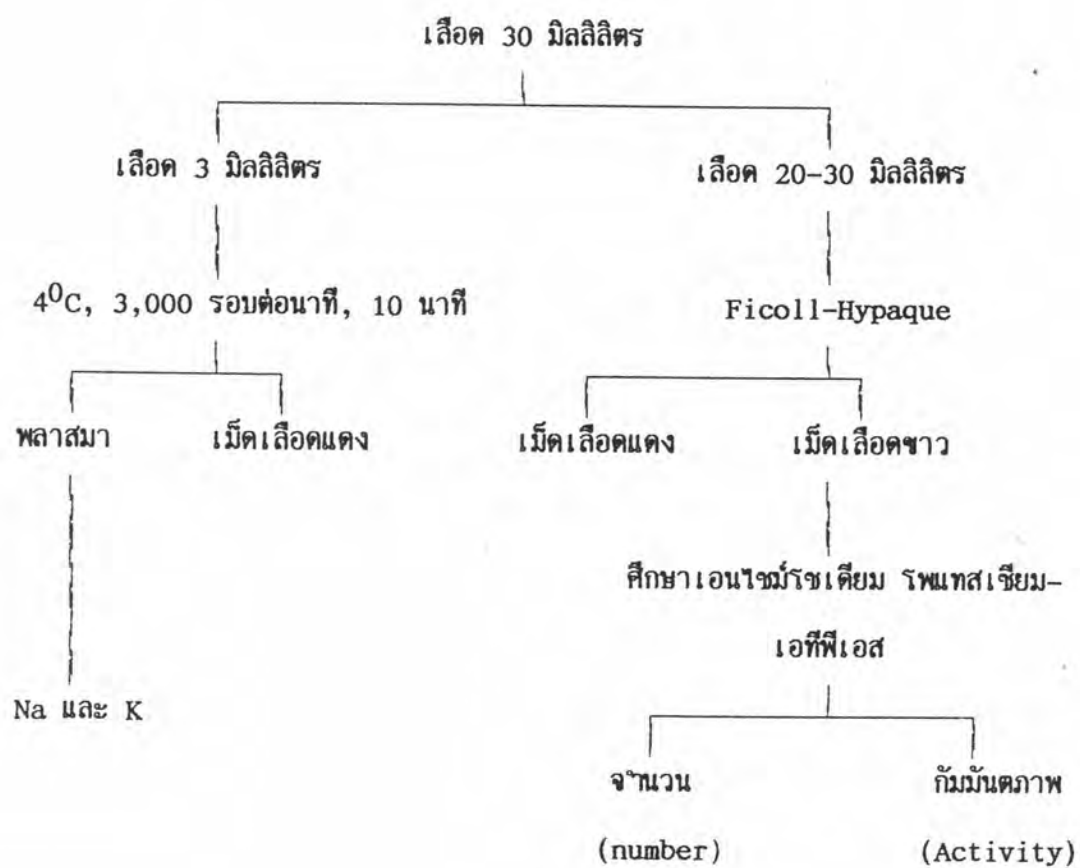
เลือดจากรกของเด็กแรกคลอด ที่ได้จากห้องคลอดจะถูกนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทันที ดังแสดงไว้ในรูปที่ 7

5.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโซเดียมและโพแทสเซียมในพลาสมา

แยกพลาสมาจากเลือดจากรกของเด็กแรกคลอด ประมาณ 3 มิลลิลิตร โดยปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกพลาสมาออกใส่หลอดที่สะอาดและแห้ง เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อส่งไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของ โซเดียมและโพแทสเซียม โดยใช้ flame photometer ภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ทันที เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ภายใน 6 เดือน

5.2 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

เลือดที่เหลือประมาณ 25 มิลลิลิตร ถูกนำมาแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยมีขั้นตอน ดังนี้



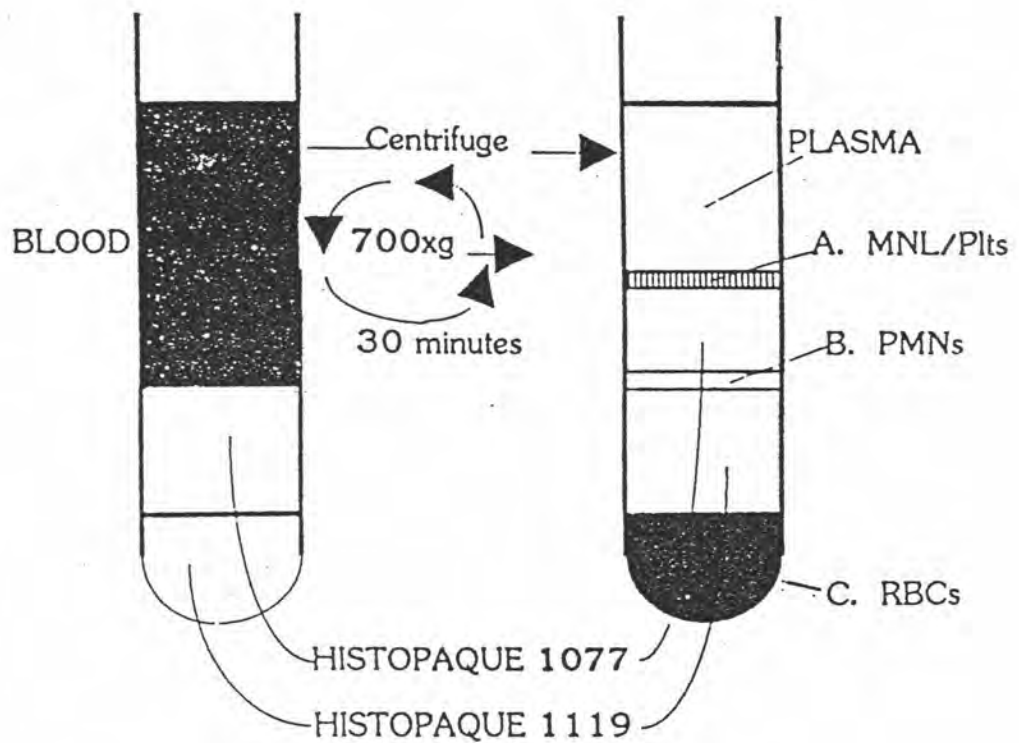
รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

1) เตรียมหลอดแก้วขนาดบรรจุ 15 มิลลิลิตร 5 หลอด ใส่สารตัวกลางในการแยก (separation medium) ชั้นแรกคือ Histopaque 1.119 ลงในหลอด 3 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมสารตัวกลางในการแยกตัวที่สอง Histopaque 1.077 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงบนชั้นของ Histopaque 1.119

2) เจือจางตัวอย่างเลือดด้วย 0.9 % NaCl ในอัตราส่วน เลือด:NaCl = 1 : 1 ค่อย ๆ เติมเลือดที่เจือจางแล้วนี้ ลงในหลอดแก้วที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1 จะเห็นลักษณะในหลอดทดลองแบ่งเป็น 3 ชั้น ชั้นล่างสุดคือ Histopaque 1.119 ชั้นที่ 2 คือ Histopaque 1.077 และชั้นบนคือเลือดที่เจือจางไว้

3) นำหลอดทั้งหมดในข้อ 2. ไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 200-500 g 30 นาที อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เมื่อบั่นแล้วจะมองเห็นในหลอดทดลองแบ่งเป็นชั้นต่าง ๆ ดังนี้ ชั้นล่างสุดคือเซลล์เม็ดเลือดแดง ชั้นที่ 2 เป็นสารตัวกลางในการแยกชนิด Histopaque 1.119 ชั้นที่ 3 ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear cell เป็นส่วนใหญ่อยู่ตรงรอยต่อระหว่าง Histopaque 1.119 และ Histopaque 1.077 ชั้นที่ 4 เป็นชั้น Histopaque 1.077 ชั้นที่ 5 ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell อยู่ตรงรอยต่อระหว่าง Histopaque 1.077 กับตัวอย่างเลือด ชั้นบนสุดคือ ส่วน plasma และ 0.9% NaCl ดังรูปที่ 8

4) นำเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ส่วนออกมารวมกัน ล้างเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วย Medium 199 (M 199) โดยปั่นล้างที่ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างเอาสารตัวกลางในการแยกออกให้หมด



รูปที่ 8 ผลการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิดจากตัวอย่างเลือด โดยใช้ Histopaque 1.119 และ 1.077 พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (agranulocytes) อยู่เหนือชั้น Histopaque 1.077 และพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear cell (granulocytes) อยู่เหนือชั้น Histopaque 1.119

5) เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เตรียมได้ มักมีเซลล์เม็ดเลือดแดงปนเปื้อน ต้องแยก เซลล์เม็ดเลือดแดงออกโดยทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ด้วยการเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วินาที พอติ เติมด้วย M 199 ประมาณ 10 มิลลิลิตร บั่นที่ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ้ายังมีเซลล์เม็ดเลือดแดงปน อยู่อีกให้เติมน้ำกลั่น แล้วบั่นล้างซ้ำอีกครั้ง

6) เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เตรียมได้ มีลักษณะขาวเหลือง นำเซลล์เม็ด เลือดขาวที่เตรียมได้นี้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพ เอนไซม์ ไซโตเคมีม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส ส่วนที่ 2 นำไปหาจำนวนเอนไซม์ ไซโตเคมีม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส

5.3 การวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพ เอนไซม์ ไซโตเคมีม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส

5.3.1 การเตรียมเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาว

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เตรียมได้ ตามข้อ 5.2 มาล้างด้วย sodium chloride histidine (SCH) buffer pH 7.5 2-3 ครั้ง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการ วิเคราะห์ขั้นต่อไปภายใน 3 วัน โดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เก็บไว้ ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้ละลาย เติมน้ำกลั่น ทั้งไว้ 20 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแตก นำไปบั่นที่ 600 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่แตก และนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แตกแล้วจะตกตะกอนที่ก้นหลอด นำส่วนน้ำใสไป บั่นที่ 15,000 รอบต่อนาที เวลา 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เยื่อหุ้มเซลล์ เม็ดเลือดขาวตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด เติม SCH buffer ลงไป ประมาณ 1-2 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร 8 หลอด เก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ ไซโตเคมีม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอสและค่าโปรตีน ในลำดับต่อไป

5.3.2 การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีการวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพของ เอนไซม์ เอทีพีเอส

ศึกษาความเที่ยงตรง (precision) ของวิธีวิเคราะห์เอนไซม์ เอทีพีเอส โดยการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (variation) ทั้ง intraassay และ interassay variation

ศึกษา intraassay variation โดยการนำเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาวคนเดียว กันที่เตรียมไว้แบ่งเป็น 5 ส่วน นำแต่ละส่วนมาวิเคราะห์หาค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ โซเดียม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส ภายในวันเดียวกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation, %CV)

ศึกษา interassay variation โดยการนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ล้างเรียบร้อยแล้ว ของคนเดียวกันแบ่งเป็น 3 ส่วน เก็บในช่อง -20 องศาเซลเซียส นำแต่ละส่วนออกมา เตรียมเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาววันละ 1 ส่วน มาวิเคราะห์หาค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ โซเดียม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า % CV

5.3.3 การวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ โซเดียม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส

หลักการวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ โซเดียม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส คือ เอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase) จะย่อยจับเสตรท (substrate) คือ ATP ในภาวะ ที่มีบัฟเฟอร์ และตัวกระตุ้น ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม โดยเอนไซม์เอทีพีเอส 1 โมเลกุลจะย่อยสลาย ATP 1 โมเลกุล ได้ฟอสฟอรัสอิสระออกมา 1 โมเลกุล ปริมาณ ฟอสฟอรัสอิสระที่เกิดขึ้น เป็นเครื่องแสดงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ATPase ตัวนั้น

วิธีที่ใช้คล้ายกับวิธีของ Baron (1985) ที่วิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ ไรโบเดียม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แสดงวิธีการ ทดลองไว้ในตารางที่ 5 โดยมีรายละเอียดดังนี้

นำเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ตามข้อ 5.3.1 จำนวน 3 หลอด มาเติม medium A (ประกอบด้วย Tris HCl 20 mM, EGTA 1mM, NaCl 100 mM, KCl 20 mM ,MgCl₂ 2 mM และ ATP 5 mM) จำนวน 0.4 มิลลิลิตร incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติม 10 % trichloro acetic acid (TCA) จำนวน 0.02 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ วัดปริมาณฟอสฟอรัสอิสระที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นเครื่องแสดงค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ ATPase ทั้งหมด ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาว

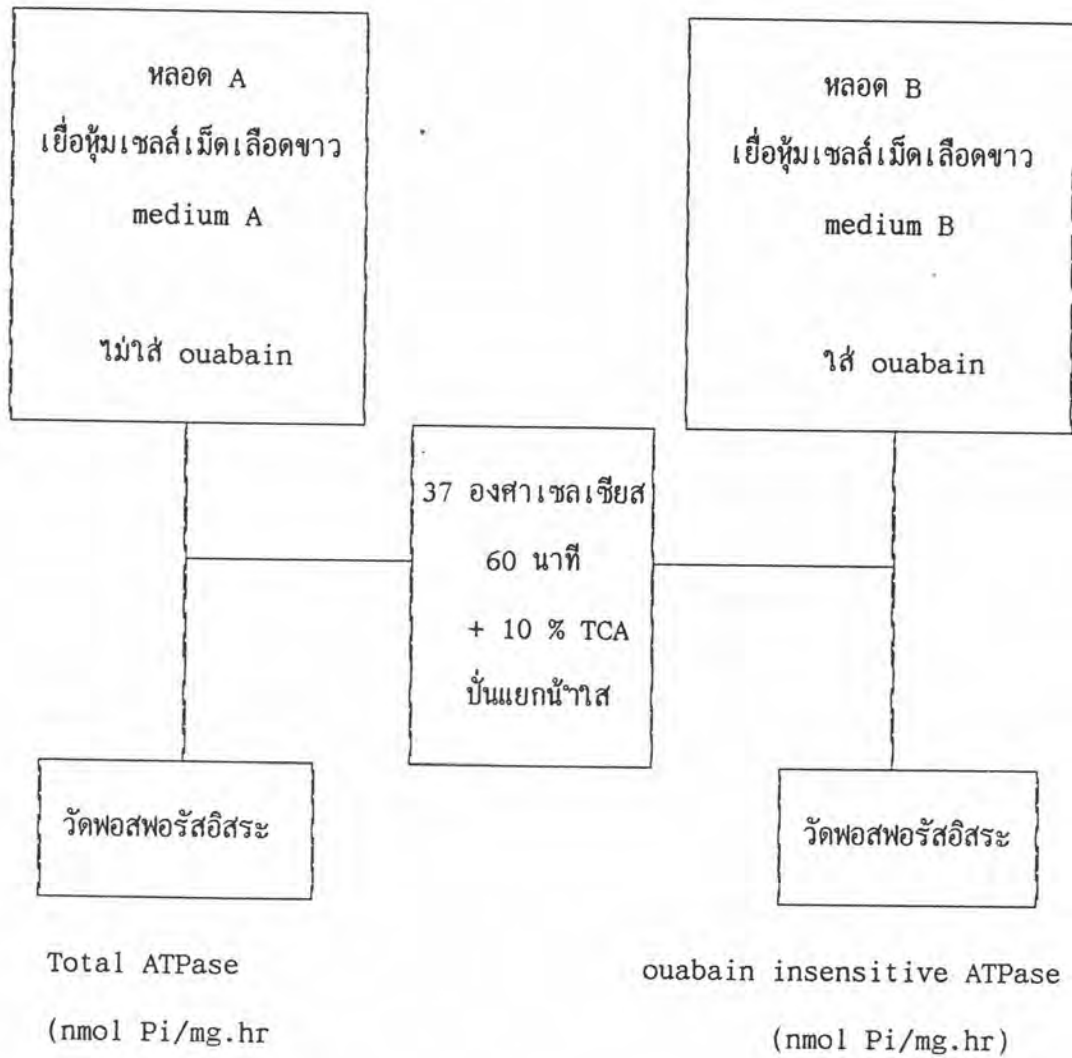
นำเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ตามข้อ 5.3.1 จำนวน 3 หลอด มาเติม medium B (ประกอบด้วย Tris HCl 20 mM, EGTA 1mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, ouabain 0.1mM และ ATP 5 mM) จำนวน 0.4 มิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์เหมือนข้างบน ปริมาณฟอสฟอรัสอิสระที่เกิดขึ้นเป็นเครื่อง แสดงค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ ATPase ที่ไม่ไวต่อวอบเนน (ouabain insensitive ATPase) แสดงขั้นตอนต่าง ๆ ดังรูปที่ 9

5.3.4 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัส หรือฟอสเฟต

วิเคราะห์ความเข้มข้นฟอสฟอรัสอิสระที่เกิดขึ้น โดยดัดแปลงจากหลักการทางปฏิกิริยา ทางเคมีทำให้เกิดสี (colorimetry) ตามวิธีของ Lawrence (1974) โดยใช้ stannous chloride-hydrazine sulfate (SnCl₂-hydrazine) เป็น reducing agent ทางปฏิกิริยากับสารละลาย acid molybdate ได้สารประกอบ molybdenum blue วัดการดูดแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 640 nm เทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ทราบความเข้มข้น แสดง

ตารางที่ 5 วิธีวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพไอโซโทปของโซเดียม โพแทสเซียม-เอทีพีเอส

น้ำยา	หลอด A			หลอด B		
	Blank A	1	2	Blank B	1	2
1. เยื่อหุ้มเซลล์	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2. 10 % TCA	0.02	-	-	0.02	-	-
3. Medium	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	นำไปอุ่นที่ 37°C 60 นาที พอดี					
10 % TCA	-	0.02	0.02	-	0.02	0.02
	นำไปปั่นที่ 3000 รอบต่อนาที 10 นาที นำน้ำใสวิเคราะห์ฟอสฟอรัสต่อไป					



ouabain sensitive ATPase = total ATPase - ouabain insensitive
(Na-K ATPase) ATPase

รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม-เอทีพีเอส
ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาว

ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ ไรโบเดียม โพรแทสเซียม-เอทีพีเอส เป็นปริมาณความเข้มข้นของ
 ฟอสฟอรัสต่อหน่วยเวลาต่อหน่วยความเข้มข้นของโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แสดง
 วิธีการทดลองไว้ในตารางที่ 6 โดยมีรายละเอียดดังนี้

นำส่วนน้ำที่ได้ออกจากการทดลองในข้อ 5.3.2 มาจำนวน 0.05 มิลลิลิตร เติม
 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 2 มิลลิลิตร และเติม 2.5 M acid molybdate
 และ SnCl_2 -hydrasine ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่
 อุณหภูมิห้อง 5 นาที วัดความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเป็นหน่วยนาโนโมล (nmol)

5.3.5 การวิเคราะห์โปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาว

วิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ ตามวิธีของ Bradford (1976)
 โดยวิธีทาบฏิกิริยากับสี Coomassie Brilliant Blue G250 ในสารละลายกรดทำ
 ให้เกิดสารเชิงซ้อนของโปรตีนกับสีเป็นสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดแสงที่ 595 nm เทียบ
 ความเข้มข้นกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ได้แสดง
 วิธีการทดลองไว้ในตารางที่ 7 โดยมีรายละเอียดดังนี้

นำเยื่อหุ้มเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 5.3.1 จำนวน 2 หลอด เติม color reagent
 3 มิลลิลิตร และ acid buffer 2 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
 5 นาที วัดความเข้มข้นของโปรตีนเป็นหน่วย มิลลิกรัม (mg)

ตารางที่ 6 วิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

	Blank	Test	Standard		
			1.6 mg%	3.2 mg%	4.8 mg%
1. ส่วนของน้ำใส	-	0.05	-	-	-
2. น้ำกลั่น	0.05	-	-	-	-
3. สารละลายมาตรฐาน ฟอสเฟต	-	-	0.05	0.05	0.05
4. 1 % SDS	2	2	2	2	2
5. 2.5 M acid molybdate	1	1	1	1	1
6. SnCl_2 -hydrazine sulfate	1	1	1	1	1

ผสมแต่ละหลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิของห้อง 5 นาที
อ่านค่าการดูดแสงที่ 640 nm โดยใช้หลอด blank เช็ท
เครื่อง spectrophotometer ให้เป็นศูนย์

ตารางที่ 7 วิธีการวิเคราะห์โปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์

หลอด	Blank	Test	Standard		
			10 mg%	20 mg%	30 mg%
1. color reagent	3	3	3	3	3
2. acid buffer	2	2	2	2	2
3. น้ำกลั่น	0.1	-	-	-	-
4. เยื่อหุ้มเซลล์	-	0.1	-	-	-
5. สารละลายมาตรฐาน	-	-	0.1	0.1	0.1

ผสมแต่ละหลอด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
อ่านค่าการดูดแสงที่ 595 nm โดยใช้หลอด blank เซ็ท
เครื่อง spectrophotometer ให้เป็นศูนย์

5.4 วิธีหาค่าจำนวนเอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม-เอทีพีเอส

5.4.1 นำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เตรียมได้ตามข้อ 5.2 มาปั่นล้างด้วย sodium dextrose HEPES buffer pH 7.4 (SDH) 3 ครั้ง เจือจางด้วย SDH และนับจำนวนเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง 8 หลอดๆละ 0.4 มิลลิลิตร นำไปศึกษาการจับกับ $[3H]$ -ouabain ที่ความเข้มข้น 8, 16, 32 และ 64 nM โดยเติม $[3H]$ -ouabain แต่ละความเข้มข้นจำนวน 0.05 มิลลิลิตร ลงใน suspension เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เจือจางไว้แล้ว ความเข้มข้นละ 2 หลอด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที ปั่นล้าง $[3H]$ -ouabain ส่วนที่ไม่จับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวออกด้วย 112 mM $MgCl_2$ นำไปปั่นที่ 1,800 รอบต่อนาที 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 5 ครั้ง เติม 5 % TCA 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ปั่นแยกส่วนน้ำใส (supernatant) มาวัดปริมาณกัมมันตรังสีด้วยเครื่อง beta-counter เป็นค่า total binding

วัดค่า non specific binding โดยการเติม 0.1 nM ouabain ลงใน suspension เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เจือจางไว้แล้ว ก่อนเติม $[3H]$ -ouabain แต่ละความเข้มข้น แล้วทำการทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้ว นำค่าแต่ละจุดที่ได้มาทำ scatchard plot หาค่าจำนวนเอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม-เอทีพีเอสต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว

5.4.2 การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีหาค่าจำนวนเอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม-เอทีพีเอส

เตรียมเม็ดเลือดขาวจากสารตัวอย่างเลือด ทำการทดลองวันละ 1 ตัวอย่าง (1 คน) แบ่งสารตัวอย่างเป็น 5 ชุด แต่ละชุดเจือจางเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มีความเข้มข้นเซลล์ต่างกัน ทำการทดลองให้จับกับ $[3H]$ -ouabain เหมือนกันทั้ง 5 ชุด

ทำภายในวันเดียวกัน คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเอนไซม์ ไรโซเดียม ไรโซเทสเซียม-เอทีพีเอส ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว แล้วนำมาหาค่า % CV

5.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงค่าข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และส่วนเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย (standard error of mean) ทดสอบความแตกต่างของค่าตัวแปรต่างๆระหว่างกลุ่มศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้ unpaired t - test และเปรียบเทียบค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear correlation) ระหว่างค่ากัมมันตภาพกับค่าจำนวนเอนไซม์ ไรโซเดียม ไรโซเทสเซียม-เอทีพีเอส ระหว่างกลุ่มศึกษา โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS/PC (Norusis, 1986)