# บทที่ 3

# วิธีทดลอง

## 3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

### 3.1.1 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร pH 8.0

ละลายกรดบอริค 6.18 กรัมในน้ำกลั่น 1,750 มิลลิลิตร เติมโปตัสเซียมคลอไรด์ 40 มิลลิกรัม แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท 40 มิลลิกรัม และแมกเนเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรท 42 มิลลิกรัม ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 2 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและใช้ภายใน 1 สัปดาห์

### 3.1.2 สารละลายโปรตีน

ละลายอัลบูมินของคน 1.1 กรัมในบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) 20 มิลลิลิตร เติมแกมมากลอบบูลินของคน 330 มิลลิกรัมผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 18 ชั่วโมง นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นของเบคแมน ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็ว 1,000xg นาน 20 นาที แยกส่วนน้ำใสใส่หลอดทดลองพลาสติคขนาด 22x75 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำมาทำให้เจือจางเป็น 10 เท่าด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1)

### 3.1.3 สารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรนที่มีความเข้มข้นของผงถ่าน 5 เปอร์เซ็นต์และเด็กซ์แตรน 0.1 เปอร์เซนต์ (Dextran-coated charcoal suspension)

ละลายเด็กซ์แตรน ที-150 จำนวน 0.05 กรัมในบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) 50 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในบีคเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมผงถ่าน 2.5 กรัม ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องคนด้วยแรงแม่เหล็ก (magnetic stirror) นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง สารละลายนี้ต้องเตรียมในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และบีคเกอร์ที่ใส่แช่อยู่ในถาดน้ำแข็งต้องเตรียมก่อนใช้ในวันที่ทำการทดลอง

3.1.4 สารละลายมาตรฐาน

3.1.4.1 สารละลายสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 2048 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายสเปอร์มิดีนไตรไฮโดรคลอไรด์ 0.3590 กรัม ในกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตรจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แบ่งมา 1 มิลลิลิตร และทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตรด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร

3.1.4.2 สารละลายพูเทรสซีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 2048 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายพูเทรสซีนไดไฮโดรคลอไรด์ 0.3742 กรัม ในกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตรจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แบ่งมา 1 มิลลิลิตร และทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตรด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร

3.1.4.3 สารละลายสเปอร์มีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 16.384 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายสเปอร์มีนเตทตระไฮโดรคลอไรด์ 0.3524 กรัมในกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตรจนได้ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร แบ่งมา 1 มิลลิลิตร และทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร

3.1.4.4 สารละลายคาดาเวอรีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 32.768 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ 28.08 มิลลิกรัมในกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร จนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

3.1.4.5 สารละลายออร์นิทีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 32.768 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายออร์นิทีนไฮโดรคลอไรด์ 20.90 มิลลิกรัมในกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร จนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ทั้งหมดเก็บไว้ในขวดพลาสติก ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.1.5 สารละลายสเปอร์มีดีนติดสลากที่มีปริมาณสารรังสี 20,000 dpm ต่อ 0.1 มิลลิลิตร

ก่อนนำสเปอร์มีดีนติดสลากมาใช้ในการทดลองต้องทดสอบความบริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 2 (ภาคผนวก) โดยทำการทดสอบทุก ๆ 2 เดือน ถ้ามีปริมาณสารรังสีเจือปนสูงเกินกว่าร้อยละ 10 จะไม่นำมาใช้ในการทดลองต่อไป

เติมสเปอร์มีดีนติดสลากที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิคูรีต่อมิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ลงในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) 40 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของสเปอร์มีดีนเป็น 58.57 พิโคกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร และมีปริมาณสารรังสีประมาณ 20,000 dpm ต่อ 0.1 มิลลิลิตร

3.1.6 สารละลายซินทิลเลชัน (Scintillation fluid)

ละลาย 2,5-ไดเฟนนิลออกซาโซล (PPO) 10 กรัมในโทลูอีน 2 ลิตร เติมไตรตรอนเอ็กซ์-100 ลงไป 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้

3.2 การเตรียมพลาสมารวมสำหรับใช้ในเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

เลือกพลาสมาที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มีดีนต่างกัน 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง และสูง นำพลาสมาแต่ละระดับมาผสมให้เข้ากันดี แบ่งใส่หลอดทดลองพลาสติคขนาด 22x75 มิลลิเมตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมคุณภาพ (quality control) ของแต่ละการทดลอง

3.3 การเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มีดีนกับโปรตีนตัวนำ

การทำให้มีการเกาะกัน (conjugate) ระหว่างโปรตีนตัวนำกับสเปอร์มีดีน ทำได้โดยมีคาร์บอไดอิมายเป็นตัวช่วยให้เกิดการเกาะกัน และใช้สเปอร์มีดีนติดสลากเป็นตัวติดตามปฏิกิริยาเพื่อจะได้ทราบว่าสเปอร์มีดีนเกาะกับโปรตีนตัวนำได้มากน้อยเท่าใด

3.3.1 การคำนวณหาน้ำหนักของสารตั้งต้นที่จะใช้ในการเตรียมคอนจูเกต

สมมติ อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้น (reagent molar ratio) ที่ต้องการใช้คือ สเปอร์มีดีน : อัลบูมิน : คาร์บอไดอิมาย เป็น 1,000 : 1 : 1,700 ดังนั้นต้องใช้ สเปอร์มีดีนไตรไฮโดรคลอไรด์ : อัลบูมิน : คาร์บอไดอิมายไฮโดรคลอไรด์

= 1,000 x 254.64 : 1 x 67,000 : 1,700 x 191.71

= 228.03 : 60 : 291.86 มิลลิกรัม

(น้ำหนักโมเลกุลของอัลบูมิน = 67,000 ดาลตัน อัลบูมินที่ใช้ต้องเป็นชนิด crystallized และ lyophilized, สเปอร์มิดีนไตรไฮโดรคลอไรด์ = 254.64 ดาลตัน และคาร์บอไดอิมายไฮโดรคลอไรด์ = 191.71 ดาลตัน)

3.3.2 การเตรียมคอนจูเกต

สารละลายที่ 1 เตรียมโดยละลายโปรตีนตัวนำ 60 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร

สารละลายที่ 2 เตรียมโดยเจือจางสเปอร์มิดีนติดสลากด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 2 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร แล้วนำมา 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสเปอร์มิดีนไตรไฮโดรคลอไรด์ 228.03 มิลลิกรัมซึ่งละลายอยู่ในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร

สารละลายที่ 3 เตรียมโดยละลายคาร์บอไดอิมายไฮโดรคลอไรด์ 291.86 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

ค่อย ๆ เติมสารละลายที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายที่ 1 จำนวน 2 มิลลิลิตร พร้อมทั้งคนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องคนด้วยแรงแม่เหล็ก แล้วจึงค่อย ๆ เติมสารละลายที่ 3 จำนวน 1 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันต่อไปเป็นเวลา 15 นาที โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25องศาเซลเซียส) แล้วอินคิวเบทต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.3 การแยกและการทำคอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยใช้เซฟฟาเด็กซ์ จี-75

แบ่งสารละลายจากข้อ 3.3.2 เก็บไว้ 150 ไมโครลิตร นำสารละลายที่เหลือ จำนวน 3.85 มิลลิลิตรเติมในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-75 (จากข้อ 3 ภาคผนวก) ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ด้วยอัตราการไหล 22 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ไว้ส่วนละ 3 มิลลิลิตร จำนวน 27 ส่วน นำแต่ละส่วนไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร ($OD_{280}$) เขียนกราฟระหว่าง $OD_{280}$ (แกนตั้ง) กับสารละลายแต่ละส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ (fraction number) (แกนนอน) จะปรากฏยอดสูง (peak) ระหว่างสารละลายส่วนที่ 10 ถึงส่วนที่ 20 รวมสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ ส่วนที่ 10 ถึง 20 แล้ววัดปริมาตรทั้งหมดที่ได้

3.3.4 การทำคอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการไดอะไลส์

นำสารละลายจากข้อ 3.3.3 ใส่ถุงไดอะไลซิสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5/8 นิ้ว นำไปไดอะไลส์ในน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) 4 ลิตร นาน 48 ชั่วโมงโดยเปลี่ยนน้ำ 4 ครั้ง แล้ววัดปริมาตรของสารละลายหลังการไดอะไลส์

3.3.5 <u>การทำคอนจูเกตให้แห้ง</u>

นำสารละลายจากข้อ 3.3.4 ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งขณะแข็ง (lyophilize) นานประมาณ 7 ชั่วโมง จะได้คอนจูเกตที่แห้งสนิทมีลักษณะเป็นผงสีขาว นำไปใส่ในขวดพลาสติคฝาเกลียวปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในกล่องพลาสติคที่มีซิลิกาเจลสีน้ำเงิน สำหรับดูดความชื้นอยู่ด้วย

3.3.6 <u>การหาอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำ</u>

ในการหาอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำ (incorporation molar ratio) จะต้องทราบปริมาณโปรตีนและปริมาณสารรังสีที่มีอยู่ในสารละลายต่อไปนี้คือ สารละลายจากข้อ 3.3.2 ซึ่งเก็บเอาไว้ 150 ไมโครลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร และสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่ได้จากข้อ 3.3.5 นำมาทำเป็นสารละลายโดยใช้สเปอร์มิดีนคอนจูเกต 4 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้ง 2 มาหาปริมาณโปรตีนและปริมาณสารรังสี

3.3.6.1 <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u>

วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายสเปอร์มิดีนคอนจูเกตจากข้อ 3.3.6 ตามวิธีของ Lowry (ข้อ 1 ภาคผนวก)

3.3.6.2 <u>การวัดปริมาณสารรังสี</u>

นำสารละลายทั้ง 2 จากข้อ 3.3.6 มาอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายซินทิลเลชัน (จากข้อ 3.1.6) 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนับจำนวนสารรังสีโดยใช้เครื่องนับรังสีเบตา (liquid scintillation counter) แต่ละสารละลายทำการทดลองซ้ำ 3 ขวด (triplicate)

3.3.6.3 <u>การคำนวณ</u>

เมื่อทราบปริมาณโปรตีนและปริมาณสารรังสีแล้ว นำมาคำนวณหาอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำดังต่อไปนี้

สมมติ ปริมาณสารรังสีในสารละลายสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่ทำให้แห้งและบริสุทธิ์แล้ว

จากข้อ 3.3.6 วัดได้ Q1 dpm ต่อปริมาณโปรตีน P มิลลิกรัม

ปริมาณสารรังสีในสารละลายก่อนผ่านคอลัมน์จากข้อ 3.3.2 จำนวน 4 มิลลิลิตร วัดได้ Q2 dpm ต่อปริมาณสเปอร์มิดีน S มิลลิกรัม

โปรตีนตัวนำมีน้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน และสเปอร์มิดีนมีน้ำหนักโมเลกุล 145.25 ดาลตัน

ดังนั้น อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำในคอนจูเกตที่ทำให้แห้งและบริสุทธิ์แล้วจะเท่ากับ $\frac{67,000 \times S \times Q1}{145.25 \times P \times Q2} : 1$

3.4 <u>การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติสเปอร์มิดีน</u>

3.4.1 <u>การเตรียมอิมมูโนเจนสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง</u>

เลือกสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนจับกับโปรตีนตัวนำในอัตราส่วนสูง ๆ มาใช้สำหรับฉีดสัตว์ทดลอง โดยละลายสเปอร์มิดีนคอนจูเกตในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำสารละลายที่ได้มาผสมกับแอดจูแวนท์ (adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยโฮโมจิไนส์ด้วย โฮโมจิไนเซอร์ (silverson) ด้วยความเร็วสูงสุดนาน 5 ถึง 10 นาที จะได้เป็นอิมัลชันลักษณะสีขาวขุ่นและมีความหนืดเหมือนน้ำมันใส่ผมบรายครีม ทดสอบว่าผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วโดยหยดลงในน้ำจะไม่แตกกระจาย การเตรียมอิมมูโนเจนนี้จะเตรียมแล้วใช้ทันที

3.4.2 <u>การฉีดอิมมูโนเจนให้สัตว์ทดลอง</u>

นำอิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ฉีดเข้าสัตว์ทดลองโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังหลาย ๆ จุด (intradermal multiple sites injection)

3.4.2.1 <u>กระต่าย</u> โกนขนที่หลังของกระต่ายโดยใช้กรรไกรและเครื่องตัดผมไฟฟ้าให้มีพื้นที่ประมาณ 4x7 ตารางนิ้ว ใช้อิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 จำนวน 2 มิลลิลิตรซึ่งมีสเปอร์มิดีนคอนจูเกตอยู่ 1 มิลลิกรัมฉีดให้กับกระต่าย 1 ตัวโดยใช้เข็มเบอร์ 25

ฉีดอิมมูโนเจนเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังประมาณ 30 จุด แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว

3.4.2.2 หนูตะเภา ทำให้หนูตะเภาสลบโดยใช้อีเทอร์ จากนั้นจึงโกนขนที่หลังของหนูตะเภาโดยใช้เครื่องตัดผมไฟฟ้าให้มีพื้นที่ประมาณ 1.5x3 ตารางนิ้ว ใช้อิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 จำนวน 0.2 มิลลิลิตรซึ่งมีสเปอร์มิดีนคอนจูเกตอยู่ 0.1 มิลลิกรัมฉีดให้กับหนูตะเภา 1 ตัว โดยใช้เข็มเบอร์ 25 ฉีดอิมมูโนเจนเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังประมาณ 7 จุด แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว

3.4.3 ระยะเวลาของการฉีดสัตว์ทดลอง

หลังจากฉีดอิมมูโนเจนให้สัตว์ทดลองครั้งแรก (first injection) แล้ว ต้องฉีดซ้ำ (booster injection) อีก เป็นระยะ ๆ ดังนี้

3.4.3.1 กระต่าย ใช้อักษรย่อ Rb แบ่งเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 (Rb1, Rb2, Rb3 และ Rb4) ฉีดซ้ำทุก 1 เดือนหรือ 4 สัปดาห์ 8 ครั้ง และฉีดทุกเดือน 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 (Rb5, Rb6 และ Rb7) ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง 4 สัปดาห์ 1 ครั้ง และ 8 สัปดาห์ 1 ครั้ง เฉพาะ Rb6 ฉีด 4 สัปดาห์อีก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 3 (Rb8 และ Rb9) ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 1 ครั้งและ 4 สัปดาห์ 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 1 และ 2 ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่มีโปรตีนตัวนำเป็นอัลบูมินของวัว ส่วนกลุ่มที่ 3 ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่มีโปรตีนตัวนำเป็นไทโรกลอบบูลินของวัว

3.4.3.2 หนูตะเภา ใช้อักษรย่อ Gp แบ่งเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 (Gp1 ถึง Gp3) ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้งและทุก 1 เดือน 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 (Gp4 ถึง Gp14) ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 4 ครั้ง

กลุ่มที่ 3 (Gp15 ถึง Gp29) ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 4 (Gp30 ถึง Gp45) ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 5 (Gp46 ถึง Gp55) ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 1 ถึง 3 ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่มีโปรตีนนำเป็นอัลบูมินของวัว ส่วนกลุ่มที่ 4 และ 5 ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่มีโปรตีนตัวนำเป็นไทโรกลอบบูลินของวัว

3.4.4 ระยะเวลาของการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง

3.4.4.1 กระต่าย เจาะเลือดก่อนฉีดอิมมูโนเจนครั้งแรกและหลังจากฉีดอิมมูโนเจนแต่ละครั้ง 2 สัปดาห์ ประมาณ 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเลือดแข็งตัว (clot) ดีแล้วนำไปแยกซีรัมโดยใช้เครื่องปั่นของเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียส ปั่นด้วยความเร็ว 1,000xg นาน 10 นาที แยกซีรัมใส่หลอดทดลองพลาสติคขนาด 12x75 มิลลิเมตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส แบ่งส่วนหนึ่งมาหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีน ถ้าพบว่าซีรัมที่เจาะในครั้งนั้น ๆ มีปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนสูง ต้องเจาะเลือดกระต่ายเพิ่มขึ้นอีก 3 ครั้ง โดยเจาะเลือดครั้งละประมาณ 25 มิลลิลิตรแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 3 วัน แยกซีรั่มของแต่ละครั้งเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส การเจาะเลือดจะเจาะที่ใบหูของกระต่าย โดยการใช้ใบมีดสำหรับผ่าตัดเบอร์ 11

3.4.4.2 หนูตะเภา เจาะเลือดก่อนฉีดอิมมูโนเจนครั้งแรกจำนวน 3 มิลลิลิตรและเจาะหลังจากฉีดอิมมูโนเจนครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ซึ่งหนูตะเภา 1 ตัวจะเจาะเลือดได้ประมาณ 15 ถึง 20 มิลลิลิตร เมื่อเลือดแข็งตัวดีแล้วจึงนำไปแยกซีรัมเช่นเดียวกับของกระต่าย เพื่อเก็บไว้หาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนต่อไป การเจาะเลือดจะเจาะจากหัวใจโดยใช้เข็มเบอร์ 21 และเจาะในขณะที่หนูตะเภากำลังสลบด้วยอีเทอร์

3.5 การหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีนที่สัตว์ทดลองสร้างขึ้น

ในการทำการทดลองใช้หลอดแช่ในถาดน้ำแข็ง หลอดทดลองที่ใช้เป็นหลอดทดลองพลาสติคขนาด 22x75 มิลลิเมตร นำซีรัมของสัตว์ทดลอง (แอนติบอดี) ที่เก็บเอาไว้จากข้อ 3.4.4 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งไปเรื่อย ๆ (serial double dilution) ด้วยบอเรตบัฟเฟอร์จากข้อ 3.1.1 ซีรัมของกระต่ายเจือจางให้เป็น 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 ส่วนซีรัมของหนูตะเภาเจือจางให้เป็น 1:100, 1:200, 1:400 และ 1:800 แล้วนำแต่ละความเข้มข้นของแอนติบอดี (จำนวน 5 ความเข้มข้น) มา 100 ไมโครลิตร เติมสเปอร์-มิดีนติดสลาก (จากข้อ 3.1.5) 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายโปรตีน (จากข้อ 3.1.2) 100 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรโดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดี อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงแยกสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (bound form) ออกจากสเปอร์มิดีนติดสลากอิสระ (free form)

โดยเติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน (จากข้อ 3.1.3) ซึ่งคนอยู่ตลอดเวลาในถาดน้ำแข็งจำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปปั่น แยกผงถ่านออกโดยใช้เครื่องปั่นของเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 6,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสทั้งหมดของแต่ละหลอดออกมา เติมสารละลายซินทิลเลชัน 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนับจำนวนสารรังสีของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี ($[^3H]$ spermidine bound) ด้วยเครื่องนับรังสีเบตา ทำการทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด (duplicate) สำหรับหลอดที่แสดงถึงปริมาณสารรังสีทั้งหมด (total $[^3H]$ spermidine) ทำเหมือนที่กล่าวข้างต้นแต่ไม่เติมสารละลาย แขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน ส่วนหลอดที่แสดงถึงความสามารถในการดูดซับของผงถ่านหรือเรียกว่า การรวมตัวที่ไม่จำเพาะ (non-specific binding, NSB) ทำเหมือนที่กล่าวข้างต้นเช่นกันแต่ไม่ใส่แอนติบอดี 2 หลอดหลังนี้ทำอย่างละ 2 หลอดเช่นเดียวกัน

คำนวณร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (% $[^3H]$ spermidine bound) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (แกนตั้ง) กับ $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของแอนติบอดี (แกนนอน) ความเจือจางของแอนติซีรัมที่ทำให้สเปอร์มิดีนติดสลากจับกับแอนติบอดีได้ร้อยละ 50 (50% $[^3H]$ spermidine bound) จะแสดงถึงไตเตอร์ของแอนติซีรัม (รูปที่ 8 หน้า 49)

<u>การคำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี</u>

$$\% \ [^3H] \text{ Spermidine bound} = \frac{[^3H] \text{ Spermidine bound (cpm)} - \text{NSB (cpm)}}{\text{Total } [^3H] \text{ spermidine (cpm)} - \text{NSB (cpm)}} \times 100$$

3.6 <u>การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแอนติสเปอร์มิดีน</u>

3.6.1 <u>การหาค่า Ka ของแอนติสเปอร์มิดีน</u> (Affinity constant of antibody)

ทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐานความเข้มข้น 0 ถึง 51,200 พิโคกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 หลอด (10 replicates) ตามรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน

| Solution | Tube | | |
|---|---|---|---|
| | Total (µl) | NSB (µl) | Std spd (µl) |
| Standard spermidine (0-51,200pg/100µl) | - | - | 100 |
| [$^3$H] Spermidine (20,000 dpm) | 100 | 100 | 100 |
| Protein solution | 100 | 100 | 100 |
| Antibody (1:10 dilution) | 100 | - | 100 |
| Borate buffer 0.05 M, pH 8.0 | 700 | 800 | 600 |

Total = Total [$^3$H] spermidine tube

NSB = Non-specific binding tube

Std spd = Standard spermidine tube

ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดี อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน (จากข้อ 3.1.3) ซึ่งคนอยู่ตลอดเวลาในถังน้ำแข็งจำนวน 100 ไมโครลิตรทุกหลอดยกเว้นหลอด Total เติมบอเรตบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรแทน ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดีตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นแยกผงถ่านออกโดยใช้เครื่องปั่นของเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 6,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสทั้งหมดของแต่ละหลอดออกมาเติมสารละลายซินทิลเลชัน 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนับจำนวนสารรังสีด้วยเครื่องนับรังสีเบตา

คำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี ([$^3$H] spermidine bound) ตามข้อ 3.5 หน้า 28 นำค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดีแต่ละความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน (10 ค่า) มาหาค่าเฉลี่ย คำนวณหาความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนที่ไม่จับกับแอนติบอดี (free spermidine) และที่จับกับแอนติบอดี (bound spermidine) ที่มีในแต่ละหลอดทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน แล้วหาอัตราส่วนของสเปอร์มิดีนที่จับแอนติอบดีกับสเปอร์มิดีนที่ไม่จับแอนติบอดี (bound/free ratio) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของสเปอร์มิดีนที่จับแอนติบอดีกับที่ไม่จับแอนติบอดี (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนที่จับกับแอนติบอดี (แกนนอน) จะได้กราฟเส้นตรงโดยได้จากการวิเคราะห์รีเกรสชันเส้นตรงแบบธรรมดา (simple linear regression) ความชัน (slope) ของเส้นกราฟจะมีค่าเท่ากับ -Ka (Scatchard, 1949)

3.6.2 <u>การหาความจำเพาะของแอนติสเปอร์มิดีน</u> (Specificity)

ศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีโดยการทดสอบร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิด (% cross reaction) ตามวิธีของ Abraham และคณะ (1969) เลือกสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสเปอร์มิดีนซึ่งอาจมีอยู่ในตัวอย่างพลาสมา เช่น พูเทรสซีน สเปอร์มีน คาดาเวอรีน และออร์นิทีน นำมาทำการทดลองพร้อม ๆ กับสเปอร์มิดีนมาตราฐาน นำสารที่ต้องการจะทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิดมาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งไปเรื่อย ๆ (serial double dilution) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ แล้วนำมาทำการทดลองตามตารางที่ 1 (หน้า 30) และใช้สารที่ต้องการทดสอบแทนสเปอร์มิดีนมาตรฐานโดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด หาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (ตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28) ในแต่ละหลอดทดลอง คำนวณโดยให้ร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดีในหลอดที่ไม่มีสเปอร์มิดีนมาตรฐานเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดีกับ $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐานและของสารที่ต้องการทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิด คำนวณหาร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดได้ดังนี้

สมมติ x เป็นปริมาณของสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่ทำให้สเปอร์มิดีนติดสลากจับกับแอนติบอดีได้น้อยลงร้อยละ 50

y เป็นปริมาณของสาร ก. ที่ต้องการทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิดที่ทำให้สเปอร์มิดีนติดสลากจับกับแอนติบอดีได้น้อยลงร้อยละ 50

ร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดของสาร ก. = $100 \frac{x}{y}$

3.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

3.7.1 ระยะเวลาของการอินคิวเบท (Incubation time)

ทำการทดลองตามตารางที่ 1 (หน้า 30 ) ใช้สเปอร์มิดีนมาตรฐาน ความเข้มข้นละ 2 หลอด โดยใช้เวลาในการอินคิวเบทต่าง ๆ กันคือ 2, 4, 18 และ 24 ชั่วโมง คำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (ตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28) ของแต่ละหลอดทดลอง เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (แกนตั้ง) กับ $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน (แกนนอน) จะได้กราฟของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน 4 เส้น ซึ่งแตกต่างกันเนื่องจากระยะเวลาของการอินคิวเบทต่างกัน

3.7.2 ปริมาตรในขณะอินคิวเบท (Incubation volume)

ทำการทดลองตามตารางที่ 1 (หน้า 30 ) ใช้สเปอร์มิดีนมาตรฐาน ความเข้มข้นละ 2 หลอด แต่ทำให้ปริมาตรทั้งหมดก่อนอินคิวเบทเป็น 0.5 และ 1 มิลลิลิตรโดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์เป็นตัวปรับปริมาตร เมื่ออินคิวเบทครบ 4 ชั่วโมง เติมบอเรตบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตรในหลอดที่มีปริมาตรในขณะอินคิวเบท 0.5 มิลลิลิตรก่อนที่จะเติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน แล้วทำการทดลองตามตารางที่ 1 ต่อไป คำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (ตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28 ) ของแต่ละหลอดทดลอง เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (แกนตั้ง) กับ $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน (แกนนอน) จะได้กราฟของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน 2 เส้นซึ่งแตกต่างกันเนื่องจากปริมาตรในขณะอินคิวเบทต่างกัน

3.8 การศึกษาความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

3.8.1 ความไวของวิธีวัด (Sensitivity)

ทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐานความเข้มข้น 0 ถึง 51,200 พิโคกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรตามตารางที่ 1 (หน้า 30) โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 หลอด (10 replicates) แล้วหาความไวของวิธีวัดตามวิธีของ Abraham (1974) โดย

คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (% [$^3$H]spermidine bound) ที่ความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐานเป็นศูนย์ ค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดีซึ่งคำนวณได้ที่ระดับความเชื่อถือได้ 95 เปอร์เซ็นต์ (mean % [$^3$H]spermidine bound of zero standard tube- 2 S.D.) นำไปอ่านค่าความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนจากกราฟมาตรฐานก็จะได้เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่วัดได้อย่างถูกต้อง ซึ่งถือว่าเป็นความไวของวิธีวัด

3.8.2 ความแม่นยำของวิธีวัด (Precision)

ใช้พลาสมารวม (pool plasma) 3 ตัวอย่างคือ พลาสมาที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีน ต่ำ กลาง และสูง จากข้อ 3.2 นำมาศึกษาความแม่นยำของวิธีวัดโดย 2 วิธีดังต่อไปนี้

3.8.2.1 ความแม่นยำในการทดลองเดียวกัน (Within assay precision)

หาปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมารวมที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่ำ กลาง และสูง ตามตารางที่ 2 (หน้า 36) โดยทำซ้ำกันตัวอย่างละอย่างน้อย 12 ครั้ง ในการทดลองเดียวกัน แล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำโดยคิดเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

3.8.2.2 ความแม่นยำระหว่างการทดลอง (Between assay precision)

หาปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมารวมที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่ำ กลาง และสูง ตามตารางที่ 2 (หน้า 36) โดยทำซ้ำกันตัวอย่างละอย่างน้อย 12 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งทำต่างวันและต่างการทดลองกัน แล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำโดยคิดเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variance, CV)

คำนวณได้จากสูตร $$\%CV = \frac{SD \times 100}{mean}$$

3.8.3 ความถูกต้องของวิธีวัด (Accuracy)

3.8.3.1 เปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรี่ (% Recovery)

นำพลาสมาตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 3,200 พิโคกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปวัดปริมาณสเปอร์มิดีนตามตารางที่ 2 หน้า 36 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีและสัมประสิทธิ์สหพันธ์ (correlation coefficient)

<u>การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรี</u>

สมมติปริมาณสเปอร์มิดีนที่มีอยู่จริง $x$ พิโคกรัมต่อหลอดทดลอง

ปริมาณสเปอร์มิดีนที่วัดได้ $y$ พิโคกรัมต่อหลอดทดลอง

ดังนั้น เปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรี $= \frac{100y}{x}$

<u>การคำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์</u>

จากสูตร $$\gamma = \frac{n\Sigma xiyi - (\Sigma xi)(\Sigma yi)}{\sqrt{n\Sigma xi^2 - (\Sigma xi)^2}\sqrt{n\Sigma yi^2 - (\Sigma yi)^2}}$$

เมื่อ $\gamma$ = สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

$xi$ = ปริมาณสเปอร์มิดีนที่มีอยู่จริง

$yi$ = ปริมาณสเปอร์มิดีนที่วัดได้

$n$ = จำนวนครั้งของความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่เติมในพลาสมา ในการทดลองนี้เติมสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 3,200 พิโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรซึ่งมี $n = 5$

3.8.3.2 <u>การศึกษาพาราดเรลลิซึม</u> (Parallelism study)

เลือกตัวอย่างพลาสมาที่มีปริมาณสเปอร์มิดีนสูง ๆ นำมาเจือจางเป็น 1:2, 1:4 และ 1:8 ด้วยบอเรตบัฟเฟอร์จากข้อ 3.1.1 แล้วหาปริมาณสเปอร์มิดีนในตัวอย่างพลาสมาที่เจือจางแล้วโดยทำไปพร้อมกับสเปอร์มิดีนมาตรฐานตามตารางที่ 2 หน้า 36 คำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดีตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28 ในหลอดที่มีตัวอย่างพลาสมาเจือจางต่าง ๆ กัน นำไปเขียนกราฟเทียบกับกราฟของสเปอร์มิดีนมาตรฐานในกระดาษ logit-log โดยให้ร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดีอยู่ในแกนตั้ง (logit scale) และการเจือจางของตัวอย่างพลาสมาและสเปอร์มิดีนมาตรฐานอยู่ในแกนนอน (log scale) จะได้กราฟเส้นตรง 2 เส้น โดยได้จากการวิเคราะห์รีเกรสชันเส้นตรงแบบธรรมดา

(simple linear regression) ทดสอบกราฟทั้ง 2 เส้นว่าขนานกันหรือไม่โดยเปรียบเทียบค่าความชัน (slope) ของกราฟทั้งสองว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้สติวเดนท์ ที เทสท์ (student's t-test)

3.9 <u>การวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์</u>

ทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของตัวอย่างพลาสมาโดยทำไปพร้อมกับสเปอร์มิดีนมาตรฐานความเข้มข้น 0 ถึง 51,200 พิโคกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate) ตามรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2 หน้า 36

คำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี ตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดี (แกนตั้ง) กับ $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน (แกนนอน) หาปริมาณสเปอร์มิดีนที่มีอยู่ในตัวอย่างพลาสมาโดยนำค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดสลากที่จับกับแอนติบอดีมาอ่านค่าความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนจากกราฟสเปอร์มิดีนมาตรฐาน

ในการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในตัวอย่างพลาสมาทุกการทดลอง จะต้องแทรกพลาสมารวมที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่ำ กลาง และสูง (จากข้อ 3.2) หลังหลอดสเปอร์มิดีนมาตรฐานความเข้มข้น 51,200 พิโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร และทุก ๆ 10 ตัวอย่างพลาสมาที่จะวัดปริมาณสเปอร์มิดีน เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพ (quality control) ของการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 16978067

ตารางที่ 2 การวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

| Solution | Tube | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Total (µl) | NSB (µl) | Std spd (µl) | Plasma (µl) |
| Standard spermidine (0-51,200 pg/100µl) | - | - | 100 | - |
| Plasma sample | - | - | - | 100 |
| [$^3$H] Spermidine (20,000 dpm) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Protein solution | 100 | 100 | 100 | - |
| Antibody (1:10 dilution) | 100 | - | 100 | 100 |
| Borate buffer 0.05 M, pH 8.0 | 700 | 800 | 600 | 700 |

ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดีแล้วอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน (จากข้อ 3.1.3) ซึ่งคนอยู่ตลอดเวลาในถาดน้ำแข็ง จำนวน 100 ไมโครลิตรทุกหลอดยกเว้นหลอด Total เติมบอเรตบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรแทน ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดีแล้วอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นแยกผงถ่านออกโดยใช้เครื่องปั่นของเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 6,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสทั้งหมดของแต่ละหลอดออกมาเติมสารละลายซินทิลเลชัน 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนับจำนวนสารรังสีโดยใช้เครื่องนับรังสีเบตา