II. วัสดุและวิธีดำเนินการ

2.1 สารเคมี

L - thyroxine sodium pentahydrate, Mann. Research Laboratories Inc., Subsidiary of B.D. Laboratory, Inc., N.Y. U.S.A.

L - thyroxine - ^{125}I, Radio Chemical Center, Amersham Bucks, England.

Anion exchange resin chloride : amberite resin IRA-400 (analytic grade), BDH, England.

Bovine albumin 22 % solution pH= 7.5 (Ortho pharmaceutical corp. Raritan, N.Y., U.S.A.)

Barbituric acid และ sodium barbitone, BDH, England.

2.2 เครื่องมือเครื่องใช้

Gelman Rapid Electrophoresis, Gelman Instrument company, Michigan, U.S.A.

Autogamma spectrometer, Model 3003, Packard, U.S.A.

2.3 ซีรัม

ซีรัมที่ใช้เป็นซีรัมจากคนไข้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้เก็บไว้ที่ - 20°ซ. ระยะเวลาที่ใช้ 2 เดือน แบ่งออกเป็น 3 จำพวก คือ

2.3.1 คนปกติ เป็นซีรัมของคนไข้ที่แพทย์ทำการวินิจฉัยแล้วว่าไม่เป็นโรคเกี่ยวกับธัยรอยด์

2.3.2 คนมีครรภ์ เป็นซีรัมของคนมีครรภ์เริ่มตั้งแต่เริ่มมีครรภ์เดือนแรกจนถึงเดือนสุดท้ายของการมีครรภ์ และแพทย์ได้วินิจฉัยแล้วว่าไม่เป็นโรคเกี่ยวกับธัยรอยด์

2.3.3 คนป่วย เป็นซีรัมของคนป่วยที่แพทย์วินิจฉัยว่าเป็นโรคเกี่ยวกับธัยรอยด์

2.4 การเตรียมสาร

- ^{125}I-L thyroxine tracer

^{125}I-L-thyroxine มี specific activity ประมาณ 50 มิลลิคูรี่ต่อมิลลิกรัม ใน 50 %aqueous propylene glycol 1 มล.

ในระหว่าง half life แรกของ ^{125}I-L-thyroxine ใช้ ^{125}I-L-thyroxine (50 มิลลิคูรี่/มล.) 10 ไมโครลิตร เติม barbital buffer (pH =8.6) จนครบ 5 มล.

ในระหว่าง half life ที่สองใช้ ^{125}I-L-thyroxine 20 ไมโครลิตร เติม barbital buffer (pH= 8.6) จนครบ 5 มล.

แล้วเก็บไว้ที่ -20°ซ.

- L-thyroxine sodium penta hydrate

ชั่ง L-thyroxine sodium penta hydrate 5 มก.ละลายด้วย 50 % propylene glycol 5 มล. จะมีความเข้มข้นเป็น 1 มก./มล.เก็บไว้ที่ 4°ซ.

นำสารละลายนี้มา 1 มล. (จาก 1 มก./มล.) เติม 1 % bovine albumin barbital buffer ให้ครบ 100 มล. จะมีความเข้มข้นเป็น 0.01 มก./มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

แล้วดูดสารละลาย (0.01 มก./มล.) มา 1 มล. ละลายด้วย 1 % bovine albumin barbital buffer จนครบ 100 มล. ความเข้มข้นครั้งสุดท้ายนี้จะเป็น 0.001 มก./มล. หรือ 100 นาโนกรัม /มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

- barbital buffer pH = 8.6

ใช้ barbituric acid 1.83 กรัม และ barbitone sodium 10.3 กรัม เติมน้ำกลั่น 3 ครั้งลงไปจนครบ 1000 ซ.ซ. จะได้สารละลายมี pH = 8.6

- 1% bovine albumin barbital buffer

ใช้สารละลาย bovine albumin (ความเข้มข้น 22% โดยน้ำหนัก pH=7.5) 4.5 มล. เติม barbital buffer (pH=8.6) จนครบ 100 มล.

- anion exchanger

ล้าง anion exchange resin (IRA 400) ด้วย barbital buffer จนกระทั่ง pH ของสารละลายที่ล้าง = 8.6 ตากเรซินให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

- การเตรียม binding protein

นำ pooled serum ของคนท้องมาเจือจางด้วย barbital buffer ในอัตราส่วน 1:5 (ซีรัม : buffer)

- การสกัดฮอร์โมนจากซีรัม

ดูดซีรัม 0.2 มล. เติม $^{125}I - T_4$ 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เพื่อให้ถึงสมดุลย์ วัดกัมมันตภาพรังสีคิดเป็น 100 % แล้วนำมาเติม 1 มล.เอธิลแอลกอฮอล์ เขย่าให้เข้ากันดี นำไปเหวี่ยงที่ 2000 rpm. 10 นาที แยก supernatant ออก

เป่า supernatant ให้แห้งด้วยแกซไนโตรเจนหรือ compressed air เมื่อแห้งแล้ว นำมาละลายด้วย barbital buffer 1.5 มล. เขย่าให้ละลายให้หมด แบ่งไปทดลอง ครั้งละ 0.5 มล. นำไปวัดกัมมันตภาพรังสี คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery

- การกำจัดฮอร์โมนออกจากซีรัม

ใช้ซีรัม 10 มล. เติมผงถ่าน 1 กรัม เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำไปเหวี่ยงที่ 2500 rpm. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยก supernantantออกมา การเหวี่ยง (centrifuge) อาจทำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อแยกผงถ่านออกให้หมดจริง ๆ ก็จะได้ซีรัมที่ดูดฮอร์โมนธัยรอกซินออกแล้ว และใช้ทำ zero determination

2.5 วิธีวัดปริมาณธัยรอกซิน

ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Ekins (1969) ซึ่งได้ดัดแปลงเล็กน้อย หลักการมีอยู่ว่า สกัดฮอร์โมนจากซีรัม แล้วเติม binding protein (หรือ antibody) และฮอร์โมนที่เป็นกัมมันตภาพรังสี อินคิวเบทระยะเวลาหนึ่งแล้วแยกส่วนที่ทำปฏิกริยาและส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยาออกจากกันด้วย adsorbent วัดกัมมันตภาพของส่วนที่ทำปฏิกริยากัน (bound) ใช้อักษรย่อ b , ออกจากส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยากับ (free) ใช้อักษรย่อ f , ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เขียนกราฟระหว่างอัตราส่วน free ต่อ bound กับความเข้มข้นของฮอร์โมนปริมาณต่าง ๆ กัน วิธีการทดลองโดยละเอียดมีดังต่อไปนี้

2.5.1 วิธีทำ serial dilution

ดูดสารละลาย 1 % bovine albumin barbital buffer ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละ 2 มล.

แล้วดูดสารละลาย L-thyroxine-sodium ในข้อ 2.4 (ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มล.) 2 มล. ใส่ในหลอดที่หนึ่ง ที่มี bovine albumin buffer อยู่แล้ว 2 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายที่ได้นี้ 2 มล. ใส่ลงในหลอดที่ 2 ซึ่งมี bovine albumin bartital buffer อยู่แล้ว 2 มล. ผสมให้เข้ากัน ทำเช่นนี้ต่อ ๆ ไปจนถึงหลอดสุดท้าย ดังนั้นความเข้มข้นครั้งสุดท้ายในแต่ละหลอดทดลองคือ

หลอดที่หนึ่ง = 25 นาโนกรัม/0.5 มล.
หลอดที่สอง = 12.5 นาโนกรัม/0.5 มล.
หลอดที่สาม = 6.25 นาโนกรัม/0.5 มล.
หลอดที่สี่ = 3.13 นาโนกรัม/0.5 มล.
หลอดที่ห้า = 1.56 นาโนกรัม/0.5มล.

2.5.2 วิธีวัด

ในไมโครปิเปต ขนาด 500 ไมโครลิตรดูดสารละลาย serial dilution ข้อ 2.5.1 ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก ความเข้มข้นละ 2 หลอด (duplicate) รวมทั้ง standard-L-thyroxine (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/0.5 มล.) เป็นหลอดที่หนึ่ง และ bovine albumin barbital buffer (ความเข้มข้นของฮอร์โมน = 0 นาโนกรัม/0.5 มล.) เป็นหลอดสุดท้าย อย่างละ 2 หลอดด้วย เรียงลำดับความเข้มข้นจาก 50,25,12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0 นาโนกรัม/0.5 มล. เป็นหลอดสุดท้าย ทั้งหมดนี้ทำควบคู่ไปกับฮอร์โมนที่สกัดไว้ตามข้อ 2.4 (ที่ต้องการจะวัด)

เติม ^{125}I-L-thyroxine ข้อ 2.4 หลอดละ 20 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม binding protein ในข้อ 2.4 ทุกหลอด หลอดละ 20 ไมโครลิตร เขย่าให้

เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปอินคิวเบทในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำออกมาเติม amberlite resin ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4 นำไปเขย่าในเครื่องเขย่า (shaker) ในตู้เย็น 45 นาที จึงเอาออกมาใส่ในแท็งค์ที่มีความเย็น 0-4 °ซ. แยก supernatant ออกจากเรซิน แล้วล้างเรซินด้วย barbital buffer 1 มล. เก็บน้ำล้างรวมกับ supernatant วัดกัมมันตภาพรังสีทั้งสองส่วน

ส่วนเรซินจะเป็นส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (f)

ส่วน supernatant เป็นส่วนที่ทำปฏิกริยา (b)

เขียนกราฟระหว่างอัตราส่วน f ต่อ b กับปริมาณความเข้มข้นของอินซูลิน (นาโนกรัม/มล.)

2.6 การศึกษาวิธีทดลองเพื่อหา thyroxine binding globulin capacity (TBG capacity) โดยวิธี reverse flow electrophoresis

2.6.1 วิธีทดลอง reverse flow electrophoresis

ได้ดัดแปลงวิธีทดลองจากวิธีของ Robbins(1956) โดยมีรายละเอียดดังนี้คือ ดูดซีรัม 34 ไมโครลิตรผสมกับ $^{125}I - T_4$ tracer 6 ไมโครลิตร ในที่สุดจะมีความเข้มข้น 1.06 ไมโครกรัม/มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

ตัดกระดาษ whatman no.I กว้าง 3.5 ซม.ยาว 18 ซม.ขีดเส้นที่จะใช้ขีดสารลงไปไว้กึ่งกลางกระดาษด้านขวาง แล้วจุ่มกระดาษลงใน barbital buffer pH = 8.6 แล้วนำขึ้นมาทำให้หมาด

ดูดซีรัมข้างบนมา 5 ไมโครลิตร ขีดลงบนกระดาษตรงเส้นที่กำหนดไว้ เว้นปลายกระดาษ 2 ข้าง ข้างละครึ่งเซ็นติเมตร นำลงเครื่อง electrophoresisที่ใส่ barbital buffer pH 8.6 ไว้ 2 ข้างไม่เท่ากัน คือระดับทางขั้วบวกสูงกว่าขั้วลบคือปริมาณทางขั้วบวก 340 มล. ระดับทางขั้วลบมีปริมาตร 150 มล. ใช้ไฟ 3.5 แอมแปร์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำขึ้นมาอบให้แห้งในตู้อบแล้วนำไปย้อมสี

2.6.2 การย้อมสี เตรียมสารละลายสีย้อม bromphenol blue โดยชั่งมา 0.35 กรัม bromphenol blue ละลายใน methanol 70 มล.เติมเมอคิวริคคลอไรด์จนอิ่มตัวใช้เป็นน้ำยาย้อมสี

จุ่มกระดาษที่ทำให้แห้งในข้อ 2.6.1 ลงในน้ำยาย้อมสีประมาณ 20 นาที แล้วนำขึ้นมาล้างด้วยกรดน้ำส้ม 1 % จนกระดาษขาว แล้วตากให้แห้ง

2.6.3 การวัดกัมมันตภาพรังสีกระดาษ

ตัดกระดาษในข้อ 2.6.2 ให้เป็น strip เล็ก ๆ ขนาดครึ่งเซ็นติเมตร วัดกัมมันตภาพรังสีเรียงตามหมายเลขที่กำหนดไว้ เขียนกราฟจะพบปริมาณกัมมันตภาพรังสีจะไปปรากฏในแถบของอัลบูมินและแถบระหว่างกึ่งกลางของแอลฟาโกลบูลิน(Inter-α-globulin) หาพื้นที่ส่วนที่ $^{125}I - T_4$ จับโปรตีนเทียบอัตราส่วน เพื่อคำนวณหา binding capacity ของ TBG

2.7 <u>การคำนวณ standard deviation (SD.) และ standard error (SE.) ของค่าเฉลี่ย (mean)</u>

ความกระจายของค่าเฉลี่ยวัดเป็น variance $= S^2$

square root ของvariance = standard deviation

mean ($\bar{X}$) $= \sum_{i=1}^{n} \frac{Xi}{n}$

Xi = ปริมาณของซีรัมเป็นไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์

n = จำนวนซีรัมตัวอย่าง

deviation from mean (d) $= Xi - \bar{X}$

standard deviation (SD.) $= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (Xi-\bar{X})^2}{n-1}}$

standard error (SE.) $= \frac{SD}{\sqrt{n-1}}$

2.8 <u>การคำนวณ percentage recovery</u>

สมมติให้ปริมาณซีรอกซินใน pooled serum มี = B ไมโครกรัม*%

ปริมาณซีรอกซินมาตรฐานที่เติมลงไป = A ไมโครกรัม %

ปริมาณซีรอกซินที่สกัดออกมาได้ทั้งหมด = X ไมโครกรัม %

∴ ปริมาณซีรอกซินที่ recovery ได้ = X - (A+B) ไมโครกรัม %

หรือ = (A+B) - X

∴ percentage recovery $= \frac{X - (A+B)}{A} \times 100$

หรือ $\frac{(A+B) - X}{A} \times 100$

---

* 1 ไมโครกรัม (microgram) $= 10^{-3}$ มก.

2.9 การคำนวณหา percentage extraction recovery ของฮอร์โมนจากซีรัม

ถ้าทดลองกับซีรัมจำนวน = A มล.

นำมาเติม ^{125}I-T_4 tracer 100 ไมโครลิตรวัดกัมมันตภาพรังสี = B count ต่อนาที (cpm.) คิดเป็น 100 %

เมื่อนำมาสกัดฮอร์โมนออกด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ แล้วเป่าให้แห้ง เติม buffer 1.5มล. แบ่งมา 0.5 มล. วัดกัมมันตภาพรังสี = C cpm.

∴ เปอร์เซ็นต์ของกัมมันตภาพรังสีในฮอร์โมนที่สะกัดได้ (1ใน 3 ส่วน)$= \frac{C \times 100}{B}$ %

∴ percentage extraction recovery $= \frac{C \times 100 \times 3}{B}$ %

2.10 การคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนที่สกัดได้จากซีรัมเป็นไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์

จากการวัด percentage extraction recovery $= \frac{C \times 100}{B}$ %

เป็น percentage extraction recovery จากปริมาณสารละลาย 0.5 มล.

เมื่อทำการวัดฮอร์โมนตามวิธี saturation analysis (Ekins, 1969) แล้วหาอัตราส่วน f ต่อ b ได้ค่า = D

เมื่อนำค่า r f/b = D ไปอ่านค่าในกราฟมาตรฐานจะพบว่าที่อัตราส่วน D นี้จะมีค่าปริมาณฮอร์โมน = E นาโนกรัม * ต่อ 0.5 มล.

ดังนั้น เปอร์เซ็นต์กัมมันตภาพรังสีของฮอร์โมน $\frac{CX100}{B}$% อ่านค่าฮอร์โมนได้ E นาโนกรัม

เมื่อคำนวณกลับหาเปอร์เซ็นต์กัมมันตภาพรังสีของฮอร์โมน 100 % อ่านค่าฮอร์โมนได้

$= \frac{E \times 100}{\frac{C \times 100}{B}}$ นาโนกรัม

เมื่อเริ่มต้นใช้ซีรัม 0.2 มล. อ่านค่าได้ $= \frac{E \times 100}{\frac{C \times 100}{B} \times 1000}$ ไมโครกรัม

เมื่อเริ่มต้นใช้ซีรัม 100 มล. อ่านค่าได้ $= \frac{E \times 100 \times 100}{\frac{C \times 100}{B} \times 1000 \times 0.2}$ ไมโครกรัม %

---

*1 นาโนกรัม (nanogram) = 10^{-6} มก.