วัสดุ และ วิธีดำเนินการทดลอง

1. การทดสอบฮีสตาลอกเสริม (augmented histalog test)

1.1 สารเคมี

Dimethylaminoazobenzene, (Merck and Co. Inc. Rahway, N.J. U.S.)

Phenolphthalein (City Chemical Corp. New York, N.Y. U.S.)

95 % Alcohol (องค์การเภสัช)

Titrisol (1 N NaOH for titration, E Merck,.Damstadt, Germany)

Histalog (betazole hydrochloride, Eli Lilly, U.S.)

Piriton injection (chlorpheneramine, B.P. G-V Ltd. Thailand). Xylocaine jelly (Astra, Sodertälje, Sweden)

1.2 เครื่องมือที่ใช้

Stomach tube (18F) Levin type (Pharmaseal, Inc. Toa Alta, Peurto Rico, U.S.)

Thermotic drainage pump, model 765A (Gomco Surgical Manufactured Corp. Buffalo, N.Y., U.S.) นำมาดัดแปลงให้เป็น intermittance suction โดย นายแพทย์ ปราโมทย์ พรพิบูลย์ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

1.3 การเตรียมสารละลาย

1.3.1 1 N NaOH เจือจาง Titrisol 1 ampoule ด้วยน้ำกลั่น จนได้สารละลาย 1 ลิตร

1.3.2 0.1 N NaOH เจือจาง 1 N NaOH 100 มล. ด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลาย 1 ลิตร

1.3.3 Topfer's reagent ละลาย dimethylaminoazobenzene 0.1 กรัม ใน 95 % alcohol 20 มล.

1.3.4 1 % phenolphthalein in alcohol ละลาย phenolphthalein 0.2 กรัม ใน 95 % alcohol 20 มล.

1.4 ผู้ถูกทดลอง แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

ก. คนปกติ เป็นผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราชที่ไม่เป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร รวม 11 ราย อายุ 14-50 ปี เป็นชาย 7 ราย เป็นหญิง 4 ราย

ข. คนป่วย แบ่งออกเป็น 4 พวก คือ

1. ผู้ป่วยด้วยโรค duodenal ulcer รวม 8 ราย อายุ 40-60 ปี เป็นชาย 7 ราย เป็นหญิง 1 ราย

2. ผู้ป่วยด้วยโรค gastric ulcer รวม 9 ราย อายุ 42-78 ปี เป็นชาย 3 ราย เป็นหญิง 6 ราย

3. ผู้ป่วยที่มีอาการของโรคแผลเปื่อยเปปติค แต่ยังแยกชนิดไม่ได้ รวม 10 ราย อายุ 19-52 ปี เป็นชาย 6 ราย เป็นหญิง 4 ราย

4. ผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร 1 ราย เป็นชาย อายุ 41 ปี

1.5 การเตรียมผู้ถูกทดลอง

หลังจากกินอาหารมื้อกลางวันแล้ว ให้ผู้ถูกทดลองงดอาหารและน้ำ ก่อนเวลา 18.00 น. ประมาณ 30 นาที ให้ผู้ถูกทดลองนอนในท่านอนหงาย แล้วใส่ stomach tube เบอร์ 18F เข้าทางจมูกของผู้ถูกทดลอง (ใช้ xylocaine jelly ทาตรงส่วนปลายของ stomach tube เพื่อลดการระคายเคืองที่ช่องจมูก) ค่อย ๆ สอดให้ stomach tube ผ่านจมูกลงไปในช่องทางเดินอาหารของผู้ถูกทดลองช้า ๆ ขณะทำการใส่ stomach tube ให้ผู้ถูกทดลองหายใจเข้าลึก ๆ และช่วยกลืน stomach tube ลงไปด้วย เมื่อส่วนปลายของ stomach tube ลงไปถึงกระเพาะอาหาร จะมีน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารบางส่วนไหลออกมา ดูดน้ำย่อยนี้ออกให้หมดแล้วทิ้งไป ทำการทดสอบให้ส่วนปลายของ stomach tube อยู่ในกระเพาะอาหาร ตำแหน่งที่เหมาะสม และสามารถดูด

น้ำย่อยออกได้ดี ตามวิธีของ Hassan และ Hobsbey (1969,1970) โดยฉีดน้ำกลั่นปริมาตร 20 มล. เข้าทางปลาย stomach tube แล้วดูดกลับ ถ้าได้น้ำปริมาตรเท่าเดิม แสดงว่า ส่วนปลายของ stomach tube อยู่ในกระเพาะอาหารในตำแหน่งที่เหมาะสม เมื่อได้เวลา 18.00 น. ต่อปลาย stomach tube เข้ากับเครื่อง intermittance continuous suction ดูดเก็บน้ำย่อยที่ออกมาตลอดคืน (overnight secretion)

1.6 การเก็บน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร

เวลา 6.00 น. ของวันรุ่งขึ้น ปิดเครื่อง suction เก็บน้ำย่อยตลอดคืนที่ได้ไว้นำมาหาปริมาณกรด (overnight secretion)

เก็บน้ำย่อยต่อไปอีก 1 ชั่วโมง โดยใช้ feeding syringe ดูดเก็บน้ำย่อย ซึ่งถือว่าเป็น สารคัดหลั่งพื้นฐาน (basal secretion) ทุก ๆ 15 นาที แล้วรวม 4 ตัวอย่างเข้าด้วยกันเป็นตัวอย่างเดียว นำไปหาปริมาณกรดเกลือ (basal acid output,BAO) จากนั้นฉีด ฮีสตาลอก ขนาด 2 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าทางกล้ามเนื้อ ดูดเก็บน้ำย่อยทุก ๆ 15 นาที เช่นกัน ใส่หลอดแยกออกเป็นน้ำย่อยที่หลั่งออกมา ทุก 15 นาที เก็บน้ำย่อยไปเป็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ก่อนฉีด ฮีสตาลอก ครึ่งชั่วโมง ฉีด piriton 2 มล. เข้าทางกล้ามเนื้อ เพื่อป้องกันฤทธิ์ข้างเคียง ของ ฮีสตาลอก)
ปริมาณกรดที่หลั่งออกมาภายหลังฉีด ฮีสตาลอก 1 ชั่วโมง เรียกว่า ปริมาณกรดในสารคัดหลั่งสูงสุด (maximal acid output, MAO)

1.7 การหาปริมาณกรดเกลือในน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร

วัดปริมาตรน้ำย่อยที่เก็บได้ในตอนกลางคืน ก่อนฉีด ฮีสตาลอก และหลังฉีดฮีสตาลอก แบ่งมา 10 มล. วัด pH แล้วติเตรตกับ 0.1 N NaOH จนถึง pH 3.5 โดยใช้ pH meter (ถ้าใช้ Topfer's reagent เป็น indicator สารละลายจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้ม) ปริมาณของ 0.1 N NaOH ที่ได้จะเข้าทำปฏิกริยาพอดีกับกรดอิสระ (free acid) ติเตรตต่อไปจนถึง pH 8.5 (ถ้าใช้ phenolphthalein เป็น indicator สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้ม) จะได้ปริมาณของกรดรวม (total acid)
ปริมาณของกรดที่ได้ บอกได้เป็น 2 แบบ คือ

1. mEq/ลิตร = จำนวน มล. ของ 0.1 N NaOH x 10
2. mEq/ชั่วโมง = จำนวน mEq ของกรดทั้งหมดที่หลั่งออกมาใน 1 ชั่วโมง

2. การวัด แกสตรินในซีรั่มด้วยวิธี radioimmunoassay.

2.1. สารเคมี

Synthetic human gastrin I (SHG:1-17,mol wt. 2200), Imperial Chemical Industries Ltd., Cheshire, England.

Anti gastrin rabbit serum, Nuclear Medical Systems Inc., California, U.S.A.

Goat anti rabbit gamma globulin, Lot No. 8/24/73, Antibodies Inc., California, U.S.A.

(125 I) NaI., Radiochemical Center, Amersham, U.K.

p-toluene sulfonamide chloride trihydrate (chloramine T) Laboratory reagent, potassium iodide (KI) analar, sodium chloride (NaCl) Laboratory reagent, sodium azide (NaN_3, Laboratory reagent), sodium metabisulphite ($Na_2S_2O_5$, laboratory reagent) BDH Chemical Ltd,, Poole, England.

Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA, Tritiplex III G.R.), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4,G.R.), disodium hydrogen phosphate dihydrate (Na_2HPO_4,G.R.), E Merck A.G. Darmstadt, Germany.

Sephadex G-10, G-25 fine, G-50 fine, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Sweden.

2.2 เครื่องมือที่ใช้

Automatic gamma spectrometer, Nuclear Chicago, Model 8741, Nuclear Chicago, Illinois, U.S.A.

Radiochromatogram scanner, Packard Model 7201, Packard, Illinois, U.S.A.

Refrigerated centrifuge Model PR-6, centrifuge Model Exd. Serial No. A8561X-2 3/4 HP, International Equipmont, Co. Massachusetts, U.S.A.

Expandomatic pH meter, Beckman, Beckman Instrument Inc. California, U.S.A.

Micromixer, Auther, H. Thomas Co. Philadelphia, U.S.A.

Hamilton microliter syringes, Hamilton Co. California, U.S.A.

Sephadex column K9/15 (0.9x15 cm.) Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden.

Automatic fraction collector, G.M. Chromatography, Illinois, U.S.A.

2.3 ผู้ถูกทดลอง แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

2.3.1. คนปกติ เป็นคนไทยปกติ ประกอบด้วย นักศึกษาแพทย์ และผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราช ที่ไม่มีอาการของโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร รวม 45 ราย อายุ 17-57 ปี เป็นชาย 32 ราย และ เป็นหญิง 13 ราย

2.3.2. คนป่วย เป็นผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราช ที่พิสูจน์ว่าเป็นโรคแล้วด้วยการ x-rays และการผ่าตัด แบ่งออกเป็น 4 พวก คือ

ก. ผู้ป่วย duodenal ulcer เป็นชาย 11 ราย อายุ 35-69 ปี

ข. ผู้ป่วย gastric ulcer รวม 12 ราย อายุ 20-73 ปี เป็นชาย 9 ราย เป็นหญิง 3 ราย

ค. ผู้ป่วยที่มีอาการทางโรคแผลเปื่อยเปปติค รวม 22 ราย อายุ 25-81 ปี เป็นชาย 21 ราย เป็นหญิง 1 ราย

ง. ผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร 16 ราย อายุ 22-69 ปี เป็นชาย 9 ราย เป็นหญิง 6 ราย

2.4 การเก็บเลือด

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่แขน (venepuncture) จากผู้ถูกทดลองที่งดอาหารเช้า ในตอนเช้า ระหว่างเวลา 6-8 นาฬิกา เจาะเลือดมาประมาณ 5 มล. เก็บเลือดที่เจาะได้ไว้ในตู้เย็น 4°C จนเลือดแข็งตัวแล้วนำมาปั่นแยกซีรั่ม เก็บไว้ที่ -20°C

จนกว่าจะทำการทดลอง

2.5. วิธีเตรียมสารละลาย

หมายเหตุ น้ำกลั่นที่ใช้ตลอดทำการทดลองเป็นน้ำกลั่นที่กลั่น 2 ครั้ง

2.5.1. 1 M KH_2PO_4 ละลาย KH_2PO_4 136.09 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.5.2. 0.5 M Na_2HPO_4 ละลาย $Na_2HPO_4.2H_2O$ 88.995 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.5.3. 0.2M KH_2PO_4 เจือจาง 1M KH_2PO_4 20 มล. ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 100มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.5.4. 0.2M Na_2HPO_4 เจือจาง 0.5M Na_2HPO_4 200มล. ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.5.5. 0.2M phosphate buffer pH 7.5

ผสม 0.2M KH_2PO_4 19.6 มล. กับ 0.2M Na_2HPO_4 80.4 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 0.2M Na_2HPO_4 เก็บไว้ในตู้เย็น 4° C

2.5.6. 0.05M phosphate buffer pH 7.4

เจือจาง 0.2M phosphate buffer pH 7.4 250มล. ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1000 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 2N HaOH เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

2.5.7. 0.15 NaCl-0,01M phosphate buffer pH 7.4

เจือจาง 0.05M phosphate buffer pH 7.4 20 มล. ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 600 มล. เติม NaCl 8.775 กรัม ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1,000 มล. เก็บไว้ในตู้เย็น 4° C

2.5.8. สารละลายที่ใช้ในการเจือจาง แกสตรินมาตรฐาน แอนติบอดี iodinated gastrin และ EDTA

ผสม 2 มล. normal rabbit serun และ 0.1 กรัม sodium azide (NaN_3) ใน 98 มล. 0.15M NaCl-0.01M phosphate buffer pH 7.4 เก็บไว้ในตู้เย็น

2.5.9. chloramine T. 16 ไมโครกรัม ต่อ 10 ไมโครลิตร

ละลาย chloramine T. 8 มก. ใน 0.05M phosphate buffer pH 7.5 5 มล. (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง)

2.5.10. Sodium metabisulphite 40 ไมโครกรัม ต่อ 10 ไมโครลิตร

ละลาย sodium metabisulphite 20 มก. ใน 0.05M phosphate buffer pH 7.5 5 มล. (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง)

2.5.11. Potassium iodide 2 มก. ต่อ 200 ไมโครลิตร

ละลาย potassium iodide 50 มก. ใน 0.05M phosphate buffer pH 7.5 5 มล. (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง)

2.5.12. 0.1M EDTA

ละลาย EDTA 3.7224 กรัม ในสารละลายที่ใช้เจือจาง 100 มล. เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

2.5.13. สารละลายมาตรฐานแกสตริน

2.5.13.1. สารละลายมาตรฐานแกสตริน ก

ละลาย 1 มก. synthetic human gastrin ใน 0.05M phosphate buffer pH 7.5 1 มล.

2.5.13.2. สารละลายมาตรฐานแกสตริน ข

(1 ไมโครกรัม ต่อ 10 ไมโครลิตร) เจือจางสารละลายมาตราฐานแกสตริน ก 100 ไมโครลิตร ด้วยสารละลาย 0.05M phosphate buffer pH 7.5 0.09 มล. สารละลายนี้ 10 ไมโครลิตร ใช้ในการ Iodination 1 ครั้ง

2.5.13.3. สารละลายมาตรฐานแกสตริน ค

($8X10^{3}$ ไมโครกรัม ต่อ 100 ไมโครลิตร) เจือจางสารละลายมาตร ฐานแกสตริน ข 10 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายที่ใช้ในการเจือจาง 12.49 มล. ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่เก็บหลอดทดลองหลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้เตรียมแกสตรินมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

2.5.13.4. สารละลายแกสตรินมาตรฐาน ความเข้มข้น 1600,800,400,200,100,50,25,12.5 และ6.25พิโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร.

a. เจือจางสารละลายแกสตรินมาตรฐาน ข้อ 2.5.13. 200 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายที่ใช้เจือจาง 9.8มล. จะได้สารละลายแกสตรินมาตรฐานความเข้มข้น 1,600พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

b. เติมสารละลาย a 5 มล. ในหลอดทดลองที่มีสารละลายที่ใช้เจือจาง 5 มล. จะได้สารละลายแกสตรินที่มีความเข้มข้น 800 พิโครกรัม ต่อ มิลลิเมตร

c. เติมสารละลาย b 5มล. ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายที่ใช้เจือจาง 5 มล. จะได้สารละลายแกสตรินที่มีความเข้มข้น 400 พิโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร

ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อย ๆ จะได้สารละลายแกสตรินที่มีความเข้มข้น 200,100,50,25,12.5 และ 6.25 พิโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร

2.6. วิธีเตรียม Sephadex column

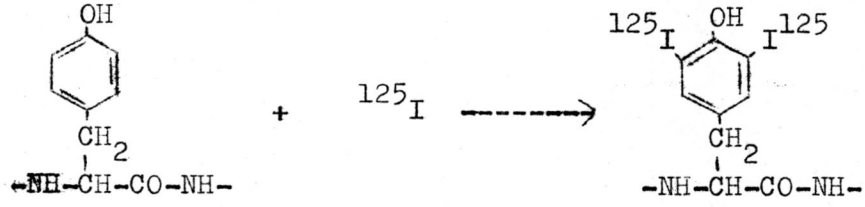
การทดลองแต่ละครั้งใช้ Sephadex G-10 6 กรัม G-25 Fine 10 กรัม G-50 Fine 10 กรัม แช่ให้บวมด้วยน้ำกลั่น 200 มล. ในตู้เย็นทิ้งไว้ค้างคืนแล้วเทน้ำกลั่นทิ้งเติม 0.05M phosphate buffer pH 7.5 เปลี่ยน buffer2-3ครั้งจนได้ pH 7.5อุ่นที่ 60°-70°C ดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดอากาศ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปบรรจุลงในคอลัมน์ Sephadex G-10 บรรจุใน Sephadex column K9/15 (0.9X15 ซม.) Sephadex G-50 Fine บรรจุในบูเรตต์ ขนาด 25 มล. (1.1 X 30 ซม.) Sephadex G-50 Fine บรรจุในบูเรตต์ขนาด 50 มล. (1.1x60 ซม.)

2.7 วิธี iodination ของแกสตริน ด้วย ไอโอดีน-125 และการทำให้บริสุทธิ์

หลักการ เมื่อมีการออกซิไดซ์ ไอโอไดด์ ให้เป็น ไอโอดีน ในที่ที่มี โปรตีนอยู่ อะตอมของ ไอโอดีน จะเข้าแทนที่ อะตอมของ ไฮโดรเจน ของกรดอมิโน tyrosine ในอนุของโปรตีน ปฏิกริยาจะเกิดเป็นขั้น ๆ ดังนี้

1. Chloramine T —ในสารละลายที่เป็นด่าง→ Hypochlorous acid

2. Sodium iodide (^{125}I) + Hypochlorous acid ------→ $^{125}I_2$

3. 

tyrosine in protein — iodinated protein

ปฏิกริยานี้จะหยุดเมื่อเติม reducing agent เช่น sodium metabisulphite ซึ่งจะไป รีดิวซ์ ไอโอดีน ให้เป็น ไอโอไดด์

4. ^{125}I + sodium metabisulphite ------→ Sodium iodide (^{125}I)

สารที่ใช้ ออกซิไดซ์ ไอโอไดด์ ให้เป็น ไอโอดีน ได้แก่ พวก persulphate iodate, nitrite และ เอนไซม์ lactoperoxidase (Holohan, 1973) ในปัจจุบันที่ใช้กันมากที่สุดได้แก่ chloramine T ซึ่งเป็นเกลือ sodium ของ N-mono chloro-p-toluene sulfonamide เป็นตัวออกซิไดซ์ chloramine T เมื่อเป็นสารละลาย จะสลายให้กรด ไฮโปคลอรัส ออกมาอย่างช้า ๆ ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์อย่างอ่อน ดังนั้น ถ้าใส่ chloramine T ลงในสารละลายโปรตีน และ ไอโอไดด์ ที่เป็นด่าง จะเกิดการ iodination ของ tyrosine เมื่อเติม sodium metabisulphite ซึ่งเป็นตัว รีดิวซ์ ลงไป ปฏิกริยา iodination จะหยุด เพราะ ไอโอดีน จะถูก รีดิวซ์ให้เป็น ไอโอไดด์ โปรตีนที่ถูก iodinate แล้วนี้จะแยกออกจากสารอื่น ๆ ได้ โดยวิธี gel filtration, dialysis, anion exchange resin, และ cellulose column การทดลองครั้งนี้ใช้วิธี gel filtration เพราะเป็นวิธีที่สดวก และง่ายกว่าวิธีอื่น ๆ และให้ผลในการแยกดีพอสมควร

วิธีทดลอง เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Chloramine T Method ของ Hunter และ Greenwood (1962) และเป็นวิธีที่ Ganguli และ Hunter (1972) ใช้ iodinate แกสตริน โดยเติมสารละลายตามรายการข้างล่างนี้ ลงในขวดที่บรรจุ NaI (^{125}I) 1 มิลลิคูรี อย่างรวดเร็ว ตามลำดับ โดยใช้ microsyringes

0.2 M phosphate buffer pH 7.5	10	ไมโครลิตร
แกสตรินสังเคราะห์ ไมโครกรัม (จากข้อ 2.5.13.2.)	10	ไมโครลิตร
chloramine T 16 ไมโครกรัม ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.5	10	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากันด้วย micro mixer 1 นาที แล้วเติม

sodium metabisulphite 40 ไมโครกรัม ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.5	10	ไมโครลิตร
potassium iodide 2 มิลลิกรัม ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.5	200	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากันด้วย micro mixer 1 นาที นำสารละลายทั้งหมดไปผ่าน sephadex G-10 column ขนาด 0.9x15 ซม. elute ด้วย 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 อัตราการไหล 0.3มล.ต่อนาที เพื่อแยกแกสตรินที่ถูก iodinate ด้วย ไอโอดีน-125 ออกจาก reagent อื่น ๆ ที่เหลือจากปฏิกริยา เก็บส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกมาจาก column ด้วย automatic fractional collector 20 ส่วน ๆ ละ 1 มล. แบ่งแต่ละส่วนมา 5 ไมโครลิตร นำไปนับหา activity ของสารกัมมันตภาพรังสีด้วย automatic gamma spectrometer นำค่าที่อ่านได้มาเขียนกราฟเพื่อหาส่วนที่เป็น iodinated gastrin peak แล้วนำไปคำนวณหา specific activity และ percentage of iodination ตามวิธีคำนวณ ข้อ 4.1 และ 4.2

ภายหลังการ iodination 1 สัปดาห์ iodinated gastrin ที่ใช้ในการทดลอง จะต้องนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกโดยนำไปผ่าน sephadex G-50 column (1.1x60 ซม) ก่อนนำไปทำการทดลอง เพื่อแยกสารที่สลายตัว และ ไม่มี immunoreactivity ออกไป iodinated แกสตริน ที่เตรียมได้เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

2.8 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับแกสตริน

เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ McGuigan (1968) ใช้หลอดทดลองขนาด 10x75 มม. แบ่งหลอดทดลองออกเป็น 3 พวก

1. พวก B สำหรับวัด iodinated gastrin ที่ไม่เข้าทำปฏิกริยา (non specific activity)

2. พวก C เป็นหลอด control หรือ zero dose

3. พวก S เป็นหลอดที่บรรจุแกสตรินมาตรฐาน ความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 และ 1600 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ ใส่ซีรั่มตัวอย่าง เมื่อทำการ assay

หลอดทดลองแต่ละพวกใส่สารละลายดังต่อไปนี้

สารละลาย	หลอดทดลอง		
	พวก B	พวก C (ไมโครลิตร)	พวก S
1. สารละลายที่ใช้เจือจาง (buffer)	300	200	100
2. 0.1 M EDTA	100	100	100
3. สารละลายแกสตรินมาตรฐาน (ข้อ 2.5.13.4.)	-	-	100
4. anti gastrin rabbit serum	-	100	100
5. iodinated gastrin (8,000 cpm.)	100	100	100

นำหลอดทดลองที่เติมสารละลายข้างต้นไป incubate ในตู้เย็น 4°C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ถึง equilibrium แล้วนำมาเติม goat anti rabbit gamma globulin (โดยไม่ต้องเจือจางเสียก่อน) หลอดละ 50 ไมโครลิตร เพื่อแยก bound form ออกจาก free form labelled gastrin นำไป incubate ในตู้เย็นต่อไปอีก 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นแยกตะกอนออกใน refrigerated centrifuge ด้วยแรงเหวี่ยง 5,000-6,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นำตะกอนที่แยกได้ไปนับหา activity ของ ไอโอดีน-125 ด้วย automatic gamma spectrometer นำผลที่ได้มาคำนวณตามวิธีข้อ 4.3 แล้วนำมาเขียนกราฟบนกระดาษกราฟชนิด semilog

2.9 วิธีทดลองหาปริมาณแกสตรินในซีรั่ม

ทำเช่นเดียวกับวิธีเตรียมกราฟมาตรฐานข้อ 2.8 แต่ใช้ซีรั่ม 0.1 มล. (100 ไมโครลิตร) แทนสารละลายแกสตรินมาตรฐาน (Yalow และ Berson (1970a) พบว่า การเตรียมกราฟมาตรฐานของแกสตรินโดยใช้แกสตรินมาตรฐานละลายใน buffer นั้นได้ผลเหมือนกับที่ใช้แกสตรินมาตรฐานละลายใน hormone free plasma) นำผลที่ได้มาคำนวณตามวิธีคำนวณข้อ 4.3 นำค่าที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบหาค่าแกสตรินจากกราฟมาตรฐานที่ทำได้ไปพร้อม ๆ กัน

3. วิธีศึกษาคุณสมบัติบางประการของ iodinated gastrin

3.1 การทดสอบความบริสุทธิ์ มี 2 วิธีคือ

3.1.1 โดยการกรองผ่าน gel (gel filtration)

หลังจากแยก iodinated gastrin ด้วย Sephadex G-10 column แล้ว จะทดสอบความบริสุทธิ์ได้โดยนำมาผ่าน Sephadex G-50 fine column ขนาด 0.8x120 ซม. (ใช้ iodinated gastrin 10 ไมโครลิตร) elute ด้วย 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 0.2 มล./นาที เก็บสารละลายที่ออกมาจาก column เป็นส่วน ๆ ส่วนละ 1 มล. แบ่งมา 10 ไมโครลิตร นำไปหา activity ของ ไอโอดีน-125 แล้วนำมาเขียนกราฟ จะได้กราฟที่มี peak เดียว ถ้า iodinated gastrin นั้นบริสุทธิ์

3.1.2 โดย thin layer chromatography

นำ iodinated gastrin fraction ที่ 3, 4 และ 5 ที่แยกได้จาก Sephadex G-10 column fraction ละ 10 ไมโครลิตร ไปหยดลงบน Silica gel G plate ขนาด 200x50 มม. หนา 0.75±0.05 มม. ที่อบแห้งสนิทแล้ว นำ plate ไปจุ่มลงใน tank ที่ equilibrate ไว้แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วย n-butanol : glacial acetic acid : น้ำ : pyridine อัตราส่วน 15 : 3 : 12 : 10 โดยปริมาตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเอา plate ออกมาทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไป scan ด้วยเครื่อง radiochromatogram scanner

3.2 การทดสอบการสลายตัวและความสามารถในการรวมตัวกับแอนติบอดี

ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีทดลองข้อ 2.8 (หลังจากการ iodination 12 วัน) iodinated gastrin ที่ใช้จะต้องนำไปทำให้บริสุทธิ์เสียก่อนโดยนำไปผ่าน Sephadex G-50 fine column ขนาด 1.1x60 ซม. การทดสอบนี้ทำเฉพาะหลอดทดลองพวก B และ C เพื่อเปรียบเทียบ เปอร์เซนต์ของการรวมตัวของ iodinated gastrin เมื่อไม่มีแกสตรินมาตรฐาน (b_o)

4. การคำนวณ

4.1 วิธีคำนวณหา specific activity ของ iodinated gastrin

จำนวน ไอโอดีน-125 ทั้งหมดก่อนทำปฏิกริยา 1 มิลลิคูรี = X cpm.

จำนวน ไอโอดีน-125 ที่ผ่านเข้า column = Y cpm.

จำนวนแกสตรินที่ใช้ในการ iodination = 1 ไมโครกรัม

จำนวนแกสตรินที่ผ่านเข้า column จะเป็นสัดส่วนกับจำนวน ไอโอดีน-125 ที่ผ่านเข้า column

เปอร์เซนต์ของ ไอโอดีน-125 ที่ผ่านเข้า column = 100Y/X

จำนวนแกสตรินที่ผ่านเข้า column = 100Y/X

แกสตริน 100 ไมโครกรัม ผ่านเข้า column = 100Y/X ไมโครกรัม

แกสตริน 1 ไมโครกรัม ผ่านเข้า column = Y/X ไมโครกรัม

ถ้าเริ่มต้นด้วยแกสตริน 1 ไมโครกรัม จะผ่านเข้า column = Y/X ไมโครกรัม

ไอโอดีน-125 จาก protein peak (gastrin peak) = Z cpm.

ไอโอดีน-125 Z cpm. = Z/X มิลลิคูรี

specific activity = (Z/X)/(Y/X)

= Z/Y มิลลิคูรี/ไมโครกรัม

4.2 วิธีคำนวณหา percent iodination โดยประมาณ

จำนวน ไอโอดีน-125 ทั้งหมดที่ผ่านเข้า column = Y cpm.

จำนวน ไอโอดีน-125 ทั้งหมดใน gastrin peak = Z cpm.

percent iodination = 100Z/Y

4.4 วิธีคำนวณหา percent b/b_o และ percent binding (b_o)

เมื่อให้ b_o เป็น เปอร์เซนต์ของ iodinated gastrin ที่ตกตะกอนในหลอดทดลองพวก C

b เป็น เปอร์เซนต์ของ iodinated gastrin ที่ตกตะกอนในหลอดทดลองพวก S

จำนวน iodinated gastrin ที่ใช้ทั้งหมดในแต่ละหลอด = X_T cpm.

" " ในหลอดทดลองพวก B หลังจากแยกน้ำใสออก = X_B cpm.

" " " C " = X_C cpm.

" " " S " = X_S cpm.

percent binding (b_o) = $(X_C - X_B)/(X_T - X_B)$ x 100

b = $(X_S - X_B)/(X_C - X_B)$ x 100

percent b/b_o = $100b/b_o$

= $(X_S - X_B)/(X_C - X_B)$ x 100

4.3 การคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) standard error of mean และ ค่า t สำหรับ student t test.

ค่าเฉลี่ย (mean, $\bar{X}$) = $\sum_{i=1}^{n} X_i/n$

เมื่อ X_i เป็นปริมาณกรด หรือ แกสตริน

n เป็นจำนวนน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร หรือ ซีรั่มตัวอย่างทั้งหมดที่ทดลอง

ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) = $\sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$

standard error of mean (SE) = $SD/\sqrt{n-1}$

ความแปรปรวน (variance, S^2) = SD^2

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$