การทดลอง

๑. การเจาะเลือด

ผู้ที่ถูกเจาะเลือดทุกคนต้องอดอาหารตั้งแต่เที่ยงคืนจนถึงรุ่งเช้าก่อนเจาะเลือด เลือดที่เจาะใช้ Heparin เป็นตัวกันแข็ง เมื่อได้เลือดแล้วนำไปปั่นที่ ๔,๐๐๐ รอบต่อนาที แยกเอาพลาสม่าออกมาสำหรับทำการทดลอง

๒. การหา Hematocrit

ใช้เลือดที่เจาะออกมาใหม่ๆใส่ใน Capillary tube (ยาว ๗๕ มม. เส้นผ่าศูนย์กลาง ๑.๕๕ มม. ภายในหลอดแก้วจะมี Heparin อยู่ด้วย) แล้วนำไปปั่นด้วย Micro - hematocrit centrifuge ความเร็ว ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๕ นาที ต่อจากนี้ก็อ่านค่าที่ได้ออกมาด้วย Hematocrit reader

๓. การวัดปริมาณโปรตีนในพลาสม่า

กราฟมาตรฐานใช้ Calibrate ของ Warner Lambert Co. ซึ่งมี ๓ ระดับ คือ

ระดับที่ ๑ มีโปรตีนเข้มข้น	๕.๑	กรัม/๑๐๐มล.
ระดับที่ ๒ มีโปรตีนเข้มข้น	๖.๙	กรัม/๑๐๐มล.
ระดับที่ ๓ มีโปรตีนเข้มข้น	๗.๘	กรัม/๑๐๐มล.

วิธีทำ

ในแต่ระดับจะมีโปรตีนเป็นผงอยู่ตามปริมาณข้างบนนี้ ก่อนใช้ต้องเปิดขวดเติมน้ำกลั่นลงไป ๕ มล. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ ๓๐ นาที หรือจนกว่าจะละลายหมด แล้วเขย่าให้เข้ากันประมาณ ๓๐ นาที เมื่อได้สารละลายแล้วก็นำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (Reinhold , ๑๙๕๓) ซึ่งได้ดัดแปลงเล็กน้อย

Blank

หลอดที่ ๑	หลอดที่ ๒
๑๐ แลมดา (λ) น้ำกลั่น	๑๐ แลมดา (λ) น้ำกลั่น
๑ มล. น้ำกลั่น	๑ มล. Biuret reagent

Standard

หลอดที่หนึ่ง	หลอดที่สอง
๑๐ แลมดา (λ) โปรตีนระดับ ๑	๑๐ แลมดา (λ) โปรตีนระดับ ๑
๑ มล. Biuret reagent	๑ มล. Serum blank

เขย่าให้เข้ากันทุกหลอดแล้ว Incubate ที่ ๓๐ – ๓๒ °C ๑๐ นาที วัดสีที่เกิดด้วย Coleman spectrophotometer ที่ Wave length ๕๕๕ mμ โดยใช้ Blank หลอดที่ ๑ สำหรับตั้งศูนย์ แล้วอ่านค่า O.D. ของ Blank2, Standard 1 & Standard 2

O.D. ของโปรตีนที่วัดได้จริงๆ = O.D.Standard 1 – O.D.Standard 2 – O.D.Blank 2

เอาค่า O.D. ที่วัดได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน ทำเช่นนี้ทั้งโปรตีนทั้งสามระดับ นำค่าที่ได้ไปพล็อตจะได้กราฟเป็นเส้นตรง ส่วนพลาสม่าที่จะหาปริมาณโปรตีนก็ทำเช่นเดียวกันกับโปรตีนมาตรฐานนี้ เมื่อได้ค่า O.D. ออกมาแล้วก็นำไปเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานที่ได้

๔. การหาปริมาณ Tryptophan ในพลาสม่า (Duggan and Udenfriend, ๑๙๖๕)

ต้องทำกราฟมาตรฐานเช่นเดียวกัน โดยทำทั้งหมด ๔ ความเข้มข้น คือ .

2.5 ⁄um / 100 ml

5.0 ⁄um / 100 ml

10.0 ⁄um / 100 ml

15.0 ⁄um / 100 ml

005253

เครื่องแก้วทั้งหมดที่ใช้ในการหาปริมาณของ Tryptophan นี้ก่อนทำต้องแช่ใน ๕๐% HNO_3 ก่อน แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น และต้องแยกเครื่องแก้วชุดนี้ไว้ต่างหาก มิฉะนั้นต้องล้างด้วย ๕๐% HNO_3 ทุกครั้ง

วิธีทำ

ทั้งพลาสม่าและ Standard ต้องทำอย่างละ ๒ หลอด (Duplicate)

๑. ๐.๑ มล. พลาสม่า หรือ Standard + ๐.๙ มล. น้ำกลั่น + ๒มล. ๑๐% TCA

๒. Blank ๑ มล. น้ำกลั่น + ๒ มล. TCA

17735270

ปิดหลอดด้วย Parafilm เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ ๑๐ นาที และนำไปปั่นที่ ๒,๕๐๐ รอบต่อหนึ่งนาที นาน ๑๕ นาที

ใช้ Pipet แยกเอาน้ำใสข้างบนออกมา ๐.๕ มล. ใส่ลงในหลอดเปล่าแล้วเติมน้ำที่ Deionized แล้ว ๑.๕ มล. เติม 0.2N H_2SO_4 ๒ มล. เขย่าให้เข้ากัน เติม ๐.๑ มล. ๙๕ % Formaldehyde ลงไปในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว นำไป Incubate ในน้ำเดือด (๙๕ - ๑๐๐°C) ๒๐ นาที นำออกมาจาก Incubator เติม ๐.๑ มล. ๕% H_2O_2 แล้ว Incubate ต่ออีก ๓๐ นาที ต่อจากนั้นจึงทำให้เย็น และเขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดแสง Fluorescent ที่เกิดขึ้นด้วย Amico-Keirs spectrophotometer โดยใช้ Wave-length ที่ ๓๖๕ mμ และ ๔๖๐ mμ

๕. <u>การหาปริมาณของกรดอะมิโนตัวอื่นๆด้วยเครื่อง Amino acid autoanalyzer</u>

(Hamilton et al, ๑๙๖๓ , Piez and Morris, ๑๙๖๐)

ก่อนอื่นพลาสม่าที่จะนำมาหากรดอะมิโนนี้ ต้องนำมาตกตะกอนเอาโปรตีนออกก่อนที่จะเก็บไว้ โดยใช้ พลาสม่า ๓ มล. ๓ มล. ๒๐% Sulfosalicylic acid เขย่าแรงๆและตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ประมาณ ๓๐ นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว ๑๐,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๓๐ นาที แยกน้ำใสข้างบนออกมา ๓ มล. (ถ้ายังไม่หากรดอะมิโนในทันทีเลย ต้องเก็บไว้ในที่ๆเย็นจัดประมาณ - ๒๐°C)

น้ำใสที่ได้มา ๓ มล. นั้นนำมาใส่ Standard nor-leucine ๐.๕ มล. , Sucrose ๐.๖๒๕ กรัม เติมน้ำจนครบ ๕ มล. เขย่าให้เข้ากัน น้ำยาที่เตรียมได้นี้ใช้แยกกรดอะมิโนได้เลยโดยใช้เครื่อง Amino acid autoanalyzer

การเตรียมเครื่อง Amino acid autoanalyzer สำหรับแยกกรดอะมิโนในพลาสม่า

๑. ต้องล้าง Resin ด้วย Buffer pH 3.1 จนเป็นกรด ทดสอบด้วยกระดาษ pH หลังจากนั้นก็ล้างด้วยด่าง 0.2N NaOH จนเป็นด่าง

๒. เตรียม Working ninhydrin จาก Stock ninhydrin โดยทำให้เจือจางด้วย ๕๐ % Methyl cellosolve แล้วใส่ในขวดสีชาที่ต่อเข้ากับถังแก๊สไนโตรเจนและ Manifold

Working ninhydrin นี้ต้องให้แก๊สไนโตรเจนผ่านอยู่ตลอดเวลา

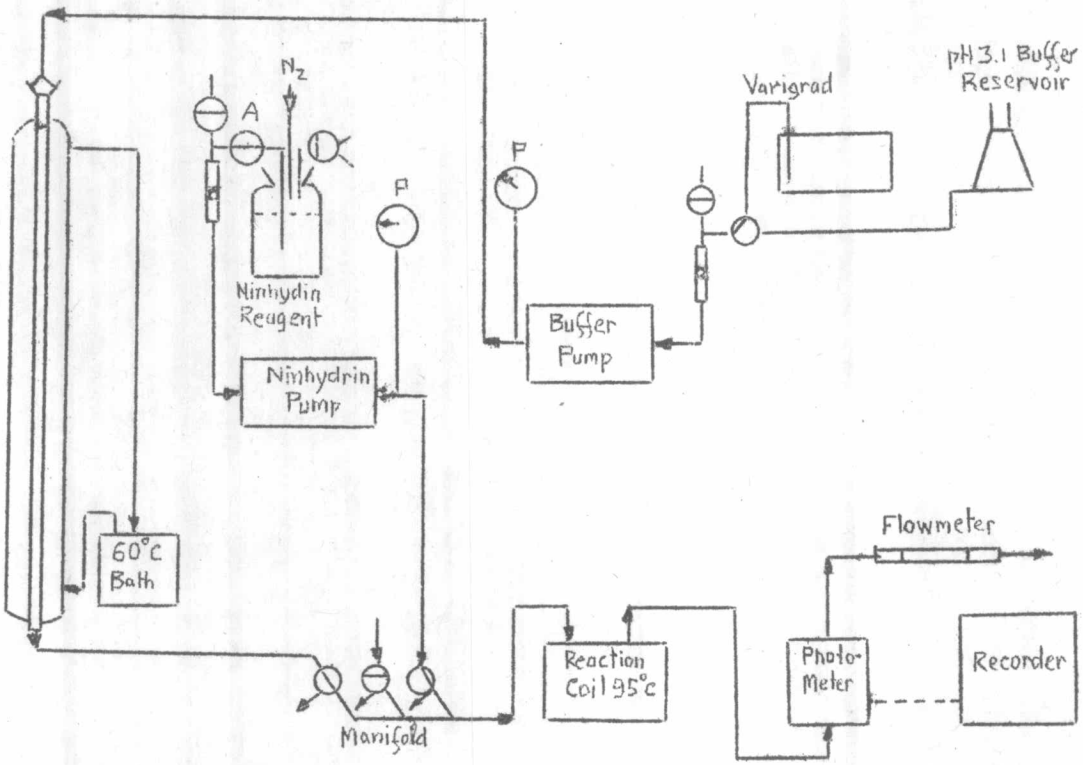
๓. เปิดเครื่อง Amino acid autoanalyzer เพื่อทำให้ Column ร้อนถึง ๖๐ °C และให้ Reaction coil ร้อนถึง ๙๕°C

๔. เตรียม Buffer ใส่ Varigrad ซึ่งมีเก้าซอง รายละเอียดอยู่ในวิธีเตรียม

๕. เมื่อความร้อนของ Reaction coil และ Column ได้ตามที่กำหนดแล้วจึง Inject sample ๑ ซีซี จากที่เตรียมไว้แล้วลงใน Column ปิด Column แล้วจึงเปิด Pump ต่อจากนั้นจึงเปิด Buffer varigrad จากนั้นตั้งทิ้งไว้เครื่องจะรายงานผลออกมาเป็นกราฟ จนเสร็จ ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ ๒๔ ชั่วโมงต่อหนึ่งตัวอย่าง

๖. นำกราฟที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยวิธีนับจุด แล้วคำนวณออกมาเป็นมิลลิกรัมต่อ ๑๐๐ มล.

DIAGRAM OF AMINO ACID AUTOANALYZER



รายละเอียดเกี่ยวกับเครื่อง Amino acid autoanalyzer

Internal standard	0.2 micro mole standard nor - leucine
Column	127 cm. x 0.62 cm.
Resin	Chromobread - type B.
Column flow rate	30 ml. / hour
Column temperature	45°C to 60°C
Column pressure	310 psi at 45°C
Gradient	9 chamber, pH 2.875 - 5.0
Cuvettes	15 - 8 - 15 mm.
Wave length	440 and 570 mμ
Chart speed	6 inch. / hour
Total time	21 hours