หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้ลิงหางยาว ซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยไพรเมท คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลิงแต่ละตัวเลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยว ทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิมขนาดของกรงกว้าง 24 นิ้ว สูง 34 นิ้ว และลึก 28 นิ้ว เรือนเลี้ยงลิงกรุด้วยลวดตาข่าย และมุ้งลวด พร้อมทั้งพัดลมดูดอากาศ เพื่อทำให้อากาศถ่ายเทได้สะดวกคล้ายคลึงสภาพธรรมชาติ อาหารเลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์และเสริมด้วย กล้วย มันเทศ แตงกวา สับปะรด ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00-9.00 น.และ 15.00-16.00 น.นอกจากนี้ยังให้ไข่ต้มสัปดาห์ละ 1 ฟองต่อตัว ลิงที่ใช้ทดลองมีดังนี้

กลุ่มที่ 1 ลิงเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์จำนวน 9 ตัว(เบอร์ 23,25, 32, 33, 51, 60, 61, 75, 608) มีอายุระหว่าง 5-12 ปี น้ำหนักอยู่ระหว่าง 4-6 กิโลกรัม ลิงเหล่านี้มีรอบประจำเดือนปกติอย่างน้อย 2 รอบ และมีช่วงอยู่ระหว่าง 29-39 วัน ก่อนทำการศึกษา และในระหว่างทำการศึกษามีรอบประจำเดือนเฉลี่ย 32$\pm$3 (X$\pm$SD) วัน

กลุ่มที่ 2 ลิงเพศเมียโตเต็มวัยและถูกตัดรังไข่ จำนวน 3 ตัว (เบอร์ 5, 6, 28) มีอายุระหว่าง 12-16 ปี น้ำหนักอยู่ระหว่าง 4-6 กิโลกรัม เป็นลิงที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างเป็นเวลานานกว่า 6 เดือน

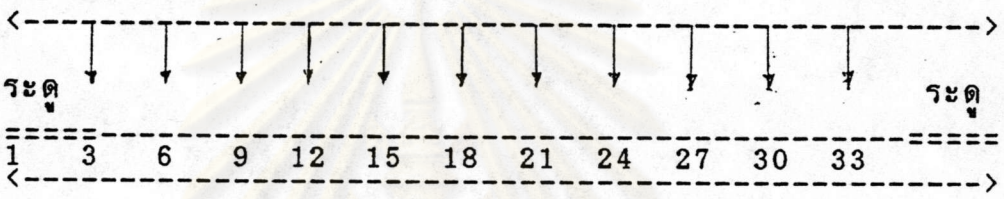
กลุ่มที่ 3 ลิงเพศผู้โตเต็มวัย จำนวน 2 ตัว (เบอร์ 46, 700) มีอายุ 12 และ 7 ปี น้ำหนักอยู่ระหว่าง 8-9 กิโลกรัม

กลุ่มที่ 4 ลิงวัยเด็กทั้งเพศเมียและเพศผู้ จำนวนอย่างละ 1 ตัว (เบอร์ 622, 518) มีอายุ 1 ปี 4 เดือน และ 1 ปี 2 เดือน น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม

1.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากลิงเพศเมียวัยเต็มวัยในกลุ่มที่ 1 โดยเริ่มเจาะเลือดในวันที่ 3 ของรอบประจำเดือน นับวันแรกที่มี menstrual bleeding ปรากฏทางช่องคลอดเป็นวันที่ 1 ของรอบประจำเดือน แล้วเจาะเลือดต่อไปทุก ๆ 3 วัน จนครบ 1 รอบประจำเดือน ดังรูปแผนภูมิ

วันที่เจาะเลือด



วันของรอบประจำเดือน

โดยกำหนดให้วันที่พบเอสตราไดออล peak เป็นวัน mid-cycle (วันที่ 0 ของรอบประจำเดือน) และนับ 15 วัน ก่อนวัน mid-cycle เป็นระยะ follicular phase นับ 15 วันหลังวัน mid-cycle เป็นระยะ luteal phase ระยะเวลาของรอบประจำเดือนของลิง #23,#25,#32,#33,#51,#60,#61,#75 และ #608 เท่ากับ 29,28,29,28,32,29,30,29 และ 39 วัน ตามลำดับ

สำหรับลิงเพศเมียวัยเต็มวัยที่ถูกตัดรังไข่ ลิงเพศผู้วัยเต็มวัย และลิงวัยเด็กเจาะเลือด 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์

เจาะเลือดจาก femoral vein บริเวณขาหนีบครั้งละ 4-5 มิลลิลิตร โดยไม่ใช้ยาสลบในช่วงระหว่างเวลา 8.00-9.00 น. ก่อนที่จะกินอาหาร ทุกครั้งหลังจากเจาะเลือดลิงจะได้รับเหล็กเสริมจาก Nutroplex (United American) เก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลานาน 15-20 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกซีรัมด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วนำซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ. จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ระดับ SHBG โปรเจสเตอโรน

เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล โดยใช้ตัวอย่างซีรัมเดียวกัน ตรวจหาสาร และฮอร์โมนทุกชนิด

สำหรับซีรัมของลิงเพศเมียโตเต็มวัยที่ถูกตัดรังไข่ ลิงเพศผู้โตเต็มวัยและลิงวัยเด็กทั้งเพศผู้ เพศเมีย หลังจากแยกซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดทั้ง 3 ครั้ง จะนำมารวมเป็น pool serum ของแต่ละกลุ่ม แล้วนำไปตรวจหาระดับ SHBG โปรเจสเตอโรน เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล

1.3 <u>สารเคมี</u>

sodium phosphate dibasic heptahydrate A.R.

sodium phosphate monobasic A.R.

sodium chloride A.R. และ diethyl ether anhydrous A.R. จาก Mallinckrodt Chemical works, St. Louis, U.S.A.

ammonium sulphate และ sodium azide จาก E.Merck, Germany

dextran T_{70} :Pharmacin Fine Chemical Uppsala, Sweden

gelatin :Kopkin & Williams Ltd.

thimerosal :BDH Chemical Ltd. Poole, England

charcoal :Matheson Coleman & Bell Co. Norwook, N.J.

liquifluor :New England Nuclear, Boston, U.S.A.

toluene, dioxane จาก J.T. Baker Chemical Co, Phillipsburg, N.J.

1.4 <u>ฮอร์โมนและแอนติบอดี</u>

ฮอร์โมนติดสลากไดไฮโดรเทสทอสเตอโรน, โปรเจสเตอโรน, เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล คือ

5 ∝ dihydro [1∝, 2∝(n)^{3} H] testosterone: TRK 395 Batch No25, 60 Ci/mmol

[1,2,6,7-^{3}H] progesterone:TRK 413 Batch No59, 82 Ci/mmol

[1,2,6,7-^{3}H] testosterone:TRK 402 Batch No56,
92 Ci/mmol

[2,4,6,7-^{3}H] estradiol-17 B :TRK 322 Batch No105,
100 Ci/mmol

จากบริษัท Amersham, U.K.

ฮอร์โมนมาตรฐานและแอนติบอดีของโปรเจสเตอโรน เทสทอสเตอโรน เอสตราไดออล และฮอร์โมนมาตรฐานคอร์ติซอล ได้จาก WHO Matched Reagent Programe, Switzerland และฮอร์โมนมาตรฐานของไดไฮโดร เทสทอสเตอโรน จาก Sigma Chemical Company, U.S.A.

2. <u>อุปกรณ์</u>

β- counter : Model 1219 Rackbeta LKB Wallac, Finland

water bath : Forma Scientific, U.S.A.

refrigerated centrifuge: MSE, model Coolspin 2, U.K.

pH meter : Corning, model 10, Evans Electroselinium limited, England

vari-whirl mixer : Van Waters & Rogers Will Scientific Co, San Francisco, U.S.A.

vortex mixer : Hook & Tucker Ltd, U.K.

magnetic stirrer No 71/4061 : Baired & Tatlock Ltd. Chad. Well Health Essen, England

eppendorf microlitre pipette (150 ul, 500 ul) : Brinkmann Instruments, Inc., Westburg, New York U.S.A.

eppendorf dispensor No 7683 และ syringe pipette : Arthur H. Thomas Co, Philadelphia, P.A. U.S.A.

013034

3. การทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการตกตะกอน SHBG ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

Phosphate buffer in saline pH 7.4

เตรียมโดยใช้ sodium phosphate monobasic 2.64 กรัม

sodium phosphate dibasic heptahydrate 21.70 กรัม

sodium chloride 9 กรัม

มาละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.3±0.1 โดยใช้ hydrochloric acid ความเข้มข้น 5 M หรือ sodium hydroxide ความเข้มข้น 5 M เติม gelatin 1 กรัม และ sodium azide 1 กรัม แล้วนำไปอุ่นจนกระทั่ง gelatin และ sodium azide ละลายเป็นเนื้อเดียวกันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ สารละลายที่ได้นี้สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 1 เดือน

Dihydrotestosterone working tracer

เตรียมโดยใช้ dihydrotestosterone stock tracer ซึ่งมีปริมาณกัมมันตภาพรังสี 50 ไมโครคูรี่/มล. ปิเปตมา 10 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วยกาซไนโตรเจน เติมบัฟเฟอร์ 5 มล. ผสมให้เข้ากันสารละลายนี้ 0.2 มล. จะได้ working tracer ซึ่งมีปริมาณกัมมันตภาพรังสี 90 นาโนคูรี่/มล. เก็บไว้ที่ 4° ซ.

Dihydrotestosterone standard

เตรียม stock solution โดยชั่งสารมาตรฐานไดไฮโดรเทสทอสเตอโรน 10 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 10 มล. จะได้ stock solution ของสารมาตรฐานไดไฮโดรเทสทอสเตอโรนที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มล ปิเปต stock solution มา 30 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วยกาซไนโตรเจนเติมบัฟเฟอร์ 100 มล.เขย่าให้เข้ากัน สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 1.035 ไมโครมิล/ลิตร ต้องเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 413.22, 5.51, 2.755,1.377 และ 0.689 นาโนมิล/ลิตร ในปริมาตรรวม 0.5 มล. ของ assay tube

Ammonium sulphate saturation

เตรียมโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. อุ่นที่อุณหภูมิ 60° ซ จนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายจนหมดตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จะมีผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตเกิดขึ้น สารละลายนี้มีความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ.

Scintillation fluid

เตรียมโดยใช้ toluene 4 แกลลอน (3.75X4 = 15 ลิตร)

liquifluor 640 มล.

dioxane 3 ลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 วิธีการวิเคราะห์หาระดับ SHBG โดยการตกตะกอน SHBG ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำซีรัมตัวอย่างมาทำให้เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:8 แล้วปิเปตซีรัมเจือจางนี้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงใน 5 หลอดทดลอง ซึ่งเป็นการทำแบบ duplicate เติมสารละลายมาตรฐานไดไฮโดรเทสทอสเตอโรน ตามที่กำหนดไว้และ dihydrotestosterone working tracer ปริมาตรอย่างละ 200 ไมโครลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารละลายในหลอดทดลองต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับ SHBG โดยวิธีทำให้ SHBG ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

หลอดทดลอง	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน DHT (nmol/L)	ปริมาตรของสารที่ใช้ในการทดลอง					อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 30°ซ นาน 30 นาที	อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 10 นาที
		สารมาตรฐาน DHT (มล)	สารติดสลาก DHT (มล)	บัฟเฟอร์ (มล)	ซีรัมเจือจาง 1:8 (มล)	รวม (มล)		
Tc	-	-	Ø.2	Ø.Ø5	-	Ø.25		
1	413.22	Ø.2	Ø.2	-	Ø.1	Ø.5		
2	5.51	Ø.2	Ø.2	-	Ø.1	Ø.5		
3	2.755	Ø.2	Ø.2	-	Ø.1	Ø.5		
4	1.377	Ø.2	Ø.2	-	Ø.1	Ø.5		
5	Ø.689	Ø.2	Ø.2	-	Ø.1	Ø.5		

หลังจากอินคิวเบทที่ 4° ซ.แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่อุณหภูมิ 4° ซ. ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ในขณะที่หลอดทดลองอยู่บนเครื่องปั่นผสม (vortex mixer)แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 3,000 รอบ/นาที (2,000 X g) ที่อุณหภูมิ 4° ซ.เป็นเวลานาน 10 นาทีปิเปตเฉพาะส่วนใสซึ่งเป็น free form ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน vial แล้วเติม scintillation fluid ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปตรวจนับปริมาณกัมมันตภาพรังสี

3.3 วิธีการคำนวณหาระดับ SHBG

คำนวณหาค่าเฉลี่ยของ total count (Tc)

จากค่า free form (F) ที่ได้นำมาคำนวณหาค่า bound form (B) จากสูตร

$$B = Tc - F$$

คำนวณหาค่า factor of nonspecific binding (fn.s) เฉพาะค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน DHT สูงสุดโดยแทนค่าสูตร

$$fn.s = B/F$$

คำนวณหาค่า total bound ของสารมาตรฐานโดยแทนค่าสูตร

$$Bt = \frac{B}{Tc} \times \text{ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน DHT}$$

คำนวณหาค่า free form ของสารมาตรฐาน (Free) โดยแทนค่าสูตร

$$Free = \frac{F}{Tc} \times \text{ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน DHT}$$

คำนวณหาค่า bound non specific (Bn.s) โดยแทนค่าสูตร

$$Bn.s = Free \times fn.s$$

คำนวณหาค่า bound specific โดยแทนค่าสูตร

$$Bs.p = Bt - Bn.s$$

สร้าง scatchard plot โดยกำหนดให้ค่า Bs.p เป็นแกน x ค่า Bs.p/Free เป็นแกน y จะเป็นกราฟเส้นตรงตัดกับแกน x อ่านค่าที่ได้จากแกน x คูณด้วย dilutionของตัวอย่างเป็นระดับของ SHBG มีหน่วยเป็นนาโนโมล/ลิตร (ตัวอย่างการคำนวณดูในภาคผนวก)

3.4 <u>การประเมินความเชื่อถือได้ของวิธีการตกตะกอน SHBG ด้วยแอมโม</u>
<u>เนียมซัลเฟต</u>

การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการตรวจวัดสารได้ใช้วิธีการของ Ekins (1970) และ Abraham (1974) ซึ่งประกอบด้วยการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) และความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity)

<u>ความจำเพาะ</u>

หมายถึง ความสามารถของ SHBG ที่สามารถทำปฏิกิริยาหรือจับกับฮอร์โมนนั้นๆ อย่างจำเพาะ SHBG เป็น β-globulin ที่มีความจำเพาะในการทำปฏิกริยาได้ดีกับ 17β-Hydroxysteroids คือไดไฮโดรเทสทอสเตอโรน,เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล (Baulien et al,1970) จากการศึกษาของ Corvol และ Bardin (1973) โดยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis พบว่าสารติดสลากไดไฮโดรเทสทอสเตอโรน ทำปฏิกริยาจำเพาะกับ SHBG โดยไม่ทำปฏิกริยากับ CBG หรืออัลบูมิน และมีบางรายงานกล่าวว่าCBG ซึ่งเป็น specific binding protein ชนิดหนึ่ง สามารถจับกับเทสทอสเตอโรนได้เล็กน้อย(Corvol et al, 1971; Anderson, 1974) ดังนั้น ไดไฮโดรเทสทอสเตอโรน ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของเทสทอสเตอโรน น่าจะมีปฏิริยาจับกับโปรตีนนี้เหมือนเทสทอสเตอโรน ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการวัดระดับ SHBG ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกริยาระหว่าง SHBG กับไดไฮโดรเทสทอสเตอโรน โดยใช้คอร์ติซอล ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ทำปฏิกริยาได้ดีกับ CBG (Anderson, 1974) ใส่คอร์ติซอล 400 นาโนโมล/ลิตร เพื่อ saturate CBG binding site แล้วทำการวัดระดับ SHBG เปรียบเทียบกับการวัดระดับ SHBGโดยไม่ใส่คอร์ติซอลไป saturate CBG binding site ทำปฏิกริยากับซีรัมเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่ต้องการเอสเสย์ แล้วดำเนินการตามขั้นตอนของวิธีการวิเคราะห์ SHBG โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความถูกต้อง

หาได้จากการนำซีรัมที่ทราบปริมาณสารที่ต้องการวัดที่แน่นอน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารในซีรัมนั้น แล้วเทียบกับปริมาณสารที่มีอยู่จริง คิดออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ก็จะทราบเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของการวิเคราะห์ ในปัจจุบันยังไม่สามารถทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ SHBG ได้โดยตรง เนื่องจากยังไม่สามารถหา SHBG ที่บริสุทธิ์ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานได้ Rosner (1972) เสนอวิธีการทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ระดับ SHBG ในทางอ้อม โดยอาศัยหลักการที่ว่า ความเข้มข้นของ SHBG จะมีความสัมพันธ์เป็นปฏิภาคโดยตรงกับอัตราความเข้มข้นของซีรัม

การทดลองครั้งนี้ได้ตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ระดับ SHBG ตามวิธีการของ Rosner โดยการนำซีรัมของมนุษย์และลิงมาเจือจางด้วยอัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วนการเจือจางซีรัมที่ใช้ในการตรวจหาความถูกต้อง

อัตราส่วนการเจือจางซีรัม	
ซีรัมมนุษย์	ซีรัมลิง
1:20	1:40
1:30	1:60
1:40	1:80
1:60	1:100
1:80	

จากนั้นวิเคราะห์หาระดับ SHBG ณ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความเข้มข้นของซีรัมกับระดับ SHBG ที่วิเคราะห์ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความแม่นยำ

หมายถึง ความสามารถในการวิเคราะห์สารแต่ละครั้งได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งจะทดสอบความแม่นยำได้โดยทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างชนิดเดียวกันหลาย ๆ ครั้งแล้วหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ โดยคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, C.V)

$$\%C.V = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร (S.D)}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต (X)}} \times 100$$

การทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ ทำโดยการทดสอบความแม่นยำของการวัด ภายในชุดเดียวกัน (intra-assay) 10 ตัวอย่าง และต่างชุดกันหรือระหว่างชุด (inter-assay) ชุดละ 10 ตัวอย่าง 3 ครั้งการทดลอง โดยใช้ pool serum ของผู้หญิงปกติเป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 90-110 นาโนโมล/ลิตร

ความไว

ความไวของการวัด คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่สามารถวัดได้ การหาความไวของการวิเคราะห์ปริมาณ SHBG โดยวิธีการทำให้ SHBG ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้ซีรัมของผู้ชาย ซึ่งมีความเข้มข้นของ SHBG ในซีรัมน้อย เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ความไวของการวัด โดยใช้ซีรัมปริมาตร 250 ไมโครลิตร

Equilibrium constant

คือค่าที่แสดงระดับความสามารถในการจับของ SHBG กับสเตรอยด์ คำนวณได้จากความชัน (slop) ของกราฟเส้นตรง scatchard plot (Ekins & Albano, 1969) ซึ่งค่า equilibrium constant จะมีความสัมพันธ์กับความไวในการวิเคราะห์ (Ekins, 1970)

3.5 การเตรียมสารละลายสำหรับเรดิโออิมมูนเอสเสย์ของฮอร์โมน

Assay buffer

ละลาย gelatin 1 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มล. อุ่นให้ gelatin ละลายจนหมด ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงละลาย

sodium dihydrogen orthophosphate	2.35 กรัม
sodium hydrogen orthophosphate (anhydrous)	11.60 กรัม
sodium chloride	8.80 กรัม
thimerosal	0.10 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. ได้นาน 1 เดือน

Charcoal suspension

เตรียมโดยใช้ dextran 0.0625 กรัม ละลายใน assay buffer 100 มล. แล้วเติม charcoal 0.625 กรัม ปั่นให้เข้ากันเป็นเวลานาน 30 นาที จะได้ charcoal suspension ความเข้มข้นร้อยละ 0.625 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เก็บไว้ที่ 4° ซ. ใช้ได้นาน 1 เดือน เวลาจะใช้ต้องนำไปปั่นให้เข้ากันโดยวางอยู่บนถาดน้ำแข็งตลอดเวลาที่ใช้

Working solution ของฮอร์โมนติดสลากรังสีโปรเจสเตอโรน เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล

เตรียมโดยใช้ stock tracer ซึ่งมีปริมาณกัมมันตภาพรังสีจำนวน 10 ไมโครคูรี่/มล. ปิเปตมา 100 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งด้วยกาซไนโตรเจน แล้วเติม assay buffer 10 มล. ผสมให้เข้ากันจะได้ working tracer ซึ่งมีปริมาณกัมมันตภาพรังสี 100 นาโนคูรี่/มล. เก็บไว้ที่ 4° ซ.

ฮอร์โมนมาตรฐานโปรเจสเตอโรน เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล

เตรียมโดยการใช้ฮอร์โมนมาตรฐานโปรเจสเตอโรน เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล จาก stock solution ที่มีความเข้มข้น 250, 220 และ 150 พิโคโมล/มล. ปิเปตมา 100 ไมโครลิตร เป่าแห้งแล้วเติม assay buffer 10 มล. จากนั้นทำ serial dilution ของฮอร์โมนมาตรฐานโปรเจสเตอโรน ให้มีความเข้มข้น 1250, 625, 312, 156, 78 และ 39 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร

เทสทอสเตอโรนให้มีความเข้มข้น1110, 555, 277, 138, 69, 34 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร

เอสตราไดออลให้มีความเข้มข้น 750, 375, 187, 93, 46, 23 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร

แอนติบอดี โปรเจสเตอโรน เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล

เตรียมโดยใช้แอนติบอดี ซึ่งอยู่ในสภาพที่ระเหยแห้ง จากองค์การอนามัยโลก นำมาเติม assay buffer ปริมาตร 10 มล. เขย่าให้ละลายแล้วใช้ทันที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรน เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล โดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

ทำตามวิธีการของ องค์การอนามัยโลก (Sufi et al, 1986) ดังนี้

การสกัดซีรัม

เอาตัวอย่างซีรัมที่แช่แข็งออกมาทำให้ละลายแล้วปิเปตลงในหลอดทดลองที่ใช้ในการสกัด โดยใช้ปริมาณตัวอย่างซีรัมดังนี้คือ

การหาโปรเจสเตอโรนในระหว่าง follicular phase ใช้ซีรัม 500 ไมโครลิตร และในระหว่าง lutealphase ใช้ซีรัม200ไมโครลิตรต่อหลอดทดลองที่ใช้ในการสกัด

การหาเทสทอสเตอโรนและเอสตราไดออล ใช้ซีรัมอย่างละ 500 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลองที่ใช้ในการสกัด หลังจากนั้นเติม 100 ไมโครลิตรของ working tracer เจือจาง 10 เท่า เพื่อทำ recovery แล้ว vortex mix นาน 30 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วเติมอีเทอร์ปริมาตร 5 มล. vortex mix อีก 2 นาที แช่แข็งส่วนที่เป็นซีรัม ซึ่งอยู่ส่วนล่างของหลอดทดลองในเอทานอลกับน้ำแข็งแห้ง รินส่วนของอีเทอร์ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปทำให้แห้งด้วยการตั้งทิ้งไว้ใน fume hood ค้างคืน นำหลอดทดลองที่ทำให้อีเทอร์แห้งสนิทดีแล้วมาทำ RIA ต่อไป

วิธีการ assay

นำหลอดทดลองที่ระเหยอีเทอร์ออกไปแล้วนั้นมาเติม assay buffer ปริมาตร 1.8 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้สักครู่ ปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 500 ไมโครลิตร 2 หลอด เป็น assay tubes ทำเป็น duplicate และอีก 500 ไมโครลิตรใส่ vial เป็น recovery แยกออกเติม scintillator 5 มล. นำไปนับปริมาณกัมมันตภาพรังสี ส่วน assay tube 2 หลอด เติมแอนติบอดี tracer พร้อม ๆ กับ standard tubes ดังในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงถึงการเติมสารละลายในหลอดต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาระดับโปรเจสเตอโรน เทสทอสเตอโรน และเอสตราไดออล

หลอดทดลอง	ปริมาณของสารที่ใช้ในการทดลอง					
	Tracer (μl)	Antiserum (μl)	Buffer (μl)	Diluted Serum (μl)	Diluted Std. (μl)	Total (μl)
Tc	100	-	600	-	-	700
NSB	100	-	600	-	-	700
Bo	100	100	500	-	-	700
Standard	100	100	-	-	500	700
Sample	100	100	-	500	-	700

หมายเหตุ Tc = total count, NSB = non specific binding

Bo = binding at zero concentration

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากเติมสารละลายตามตารางที่ 3 แล้ว vortex mix แต่ละ assay tube ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วเก็บไว้ที่ 4° ซ. เป็นเวลานาน 20-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติม charcoal suspension จำนวน 200 ไมโครลิตร ซึ่งตลอดเวลาในการปิเปต ต้องปั่นให้เข้ากันและวางอยู่บนถาดน้ำแข็งตลอดเวลา (ยกเว้นหลอด total count) เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง อีกนาน 15 นาที centrifuge ที่ 3,000 รอบ/นาที(2,000xg) อุณหภูมิ 4° ซ. นาน 15 นาที รินส่วนใสลงใน vial เติม scintillation fluid ปริมาตร 5 มล. และนำ recovery vial ซึ่งเติม scintillation fluid ปริมาตร 5 มล. เช่นเดียวกัน นำไปเข้าเครื่อง β-counter

สำหรับ total count ของ recovery เพื่อตรวจนับปริมาณกัมมันตภาพรังสีที่เติมลงไปก่อนการสกัด ซึ่งจะนำไปใช้ในการคำนวณเปอร์เซนต์ recovery โดยปิเปต 100 ไมโครลิตร ของ working tracer ที่เจือจาง 10 เท่าใน assay buffer ลงใน vial เติม 0.4 มล. buffer เพื่อให้ปริมาตรเท่ากับ recovery vial เติม 5 มล. scintillatin fluid ทำเป็น duplicate แล้วนำไปเข้าเครื่อง β-counter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การคำนวณผลทางเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

กราฟมาตรฐาน

นำค่า cpm ของ standard แต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้วลบออกด้วย NSB ($\bar{X}$ - NSB) นำแต่ละค่าไปคำนวณหา B/Bo x 100 แล้วนำไป plot กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็นเฟมโตโมล/หลอด บนกระดาษกราฟเซมิลอก

ตัวอย่างซีรัม

นำค่า cpm ของแต่ละตัวอย่างซีรัม ซึ่งเป็น duplicate มาหาค่าเฉลี่ยลบออกด้วย NSB แล้วนำไปอ่านความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานได้ค่าเป็นเฟมโตโมล/หลอด เปลี่ยนให้เป็นเฟมโตโมล/มล. โดยคิดจากปริมาตรที่ใช้และใช้ค่าเปอร์เซ็นต์ recovery มาคำนวณหาค่าที่ควรจะเป็นจริง

เปอร์เซ็นต์ recovery คำนวณจากสูตร

% recovery ของแต่ละตัวอย่าง

$$= \frac{\text{cpm of recovery vial from each sample}}{\bar{X} \text{ cpm of total count of recovery}} \times 100$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8 การประเมินความเชื่อถือได้ของเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

ตามวิธีการของ Ekins (1970) และ Abraham (1974) ดังนี้คือ

ความจำเพาะ

ความจำเพาะของเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ หมายถึง ความจำเพาะในการทำปฏิกริยาของแอนติบอดี กับแอนติเจนหรือฮอร์โมน แอนติบอดีที่ได้จากการฉีดแอนติเจน กระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดี จะเป็นแบบ polyclonal ดังนั้นมักจะมีปฏิกริยากับสารอื่น ในทางปฏิบัติจะทำการทดสอบปฏิกริยาของแอนติบอดีกับสารอื่นที่มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ เรียกปฏิกริยาการทดสอบนี้ว่า cross reaction คำนวณได้จาก

% cross reaction

= ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกริยากับแอนติบอดีได้50%X100
ปริมาณของสารมาตรฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกริยากับแอนติบอดีที่ 50%

แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองได้จากองค์การอนามัยโลก (Sufi et al, 1986) ซึ่งทดสอบ % cross reaction ได้ดังตารางที่ 4, 5, 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี โปรเจสเตอโรน ที่ทำปฏิกริยากับสารต่าง ๆ

สาร	% cross reaction
Progesterone	100
Cortisol	0.005
Testosterone	0.1
17α-Hydroxyprogesterone	1.0
20α-Dihydrotestosterone	2.7

ตารางที่ 5 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี เทสทอสเตอโรน ที่ทำปฏิกริยากับสารต่าง ๆ

สาร	% cross reaction
Progesterone	100
Cortisol	0.0001
5α-Dihydrotestosterone	14
4 -Androstenedione	1.8
5α-Androstanediol	6
5 - Androstenediol	2.1

ตารางที่ 6 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี เอสตราไดออล ที่ทำปฏิกริยากับสารต่าง ๆ

สาร	% cross reaction
Estradiol	100
Estriol	0.8
Estrone	< 0.02
Cortisol	< 0.02
Progesterone	0.02
Testosterone	< 0.02

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความแม่นยำ

หมายถึง ความสามารถในการวิเคราะห์สารแต่ละครั้งได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งจะทดสอบความแม่นยำโดยทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสามระดับ คือ ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง ชนิดละ 10 ตัวอย่าง แล้วคำนวณหาความแม่นยำของการวิเคราะห์แต่ละระดับความเข้มข้น โดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณ SHBG

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความแม่นยำของการวัด ด้วยการวิเคราะห์ฮอร์โมนที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ ความเข้มข้นภายใน assay ชุดเดียวกัน (intra-assay) อย่างละ 10 ตัวอย่าง และต่างชุดกันหรือระหว่างชุด (inter-assay) ของการทดลอง 3 ครั้ง

การหาความแม่นยำของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ค่าต่ำ ค่ากลาง และค่าสูง ใช้ pool serum ของผู้หญิงปกติในช่วง follicular phase, mid cycle และ luteal phase ซึ่งมีค่าประมาณ 2, 4 และ 10 นาโนโมล/ลิตร ตามลำดับ

การหาความแม่นยำของฮอร์โมนเทสทอสเตอโรน ค่าต่ำใช้ pool serum ของผู้หญิงปกติมีค่าประมาณ 1.5 นาโนโมล/ลิตร ค่ากลางใช้ pool serum ของผู้ชายปกติ มีค่าประมาณ 15 นาโนโมล/ลิตร และค่าสูงใช้ pool serum ของผู้ชายปกติมาเติมสารมาตรฐานเทสทอสเตอโรนลงไป 15 นาโนโมล/ลิตร หรือ 4320 นาโนกรัม/ลิตร จะได้ pool serum ค่าสูงที่มีความเข้มข้นประมาณ 30 นาโนโมล/ลิตร

การหาความแม่นยำของฮอร์โมนเอสตราไดออล ค่าต่ำได้จาก pool serum ของผู้หญิงปกติในช่วง follicular phase ซึ่งมีค่าประมาณ 500 พิโคโมล/ลิตร มาเติม pool serum ของผู้ชายปกติลงไปในอัตราส่วน 1:3 จะได้ pool serum มีความเข้มข้นประมาณ 160 พิโคโมล/ลิตร ค่ากลางใช้ pool serum ของผู้หญิงปกติในช่วง mid-cycle มีค่าประมาณ 1300 พิโคโมล/ลิตร สำหรับค่าสูงใช้ pool serum ของผู้หญิงปกติในช่วง mid-cycle มาเติมสารมาตรฐานเอสตราไดออลลงไป 1,000 พิโคโมล/ลิตร หรือ 272 พิโคกรัม/มล. จะได้ pool serum ที่มีความเข้มข้นประมาณ 2,300 พิโคโมล/ลิตร

<u>ความถูกต้อง</u>

ความถูกต้องของการวิเคราะห์หาได้จากการนำซีรัม ที่ทราบปริมาณฮอร์โมน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนในซีรัมนั้นตามขั้นตอน แล้วเทียบกับปริมาณฮอร์โมนที่แท้จริง คิดออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ ก็จะทราบเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของการวิเคราะห์

$$\%\text{ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนจริง}} \times 100$$

ทำโดยปิเปตฮอร์โมนมาตรฐานเอสตราไดออล = 27.2 พิโคกรัม (หรือ 100 เพมโตโมล/100 ไมโครลิตร) โปรเจสเตอโรน = 31.4 พิโคกรัม (หรือ 100 เพมโตโมล/100 ไมโครลิตร) และเทสทอสเตอโรน = 31.68 พิโคกรัม (110 เพมโตโมล/50 ไมโครลิตร) ใส่ลงในซีรัม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วสกัดด้วยอีเทอร์ 5 มล. นาน 1 นาที นำไปผ่านขบวนการทางเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ ซึ่งจะทำการตรวจวัดความถูกต้องของการเอสเสย์ฮอร์โมนครั้งละ 10 ตัวอย่างของการทดลอง 3 ครั้ง

ความไวของการวิเคราะห์

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึง ค่าที่น้อยที่สุดของฮอร์โมนที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ทำได้โดยการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าเฉลี่ย cpm จากจุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (Bo) ลบด้วย 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดนี้นำค่า cpm นี้ไปคำนวณหาค่า B/Bo X 100 แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐาน จะได้ค่าความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Abraham, 1974) การหาความไวของวิธีการวิเคราะห์นี้ได้ทำซ้ำ 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยจากผลที่ได้

4. การวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ($X \pm SEM$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม โดยใช้ student's paired และ unpaired t-test ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ในกรณีที่เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในระหว่างวันต่าง ๆ ของรอบประจำเดือน จะใช้ค่าสถิติ Least Significant Difference (LSD)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย