วัสดุและวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุ

1. สารเคมี

Sodium($^{125}_{1}$I) iodide (Radiochemical , Amersham , U.S.A.)

Guinea-pig anti HGH serum (# 2-5-19) จากการเตรียมของ Yalow และ Berson , Radioisotope Service ,Veterans Administration Hospital Bronx , New York และ immunoassay grade HGH (NIH-GH-HS/648E) (National Institue of Health , Bethesda , Maryland , U.S.A.)

Goat anti guinea-pig gammaglobulin p.4 lot no.1973 8-5-74 (Antibodies Inc. California , U.S.A.)

Heparin sodium USP XVIII 5000 i.u./ml. (Nordmark Werke GMBH Hamberg , Germany)

Crystalline insulin (N.V. Organon)

Sephadex G-50 fine และ G-100 fine (Pharmacia Fine Chemical Uppsala ,Sweden)

n-Butanol , analar (Hopkin & Williams Ltd. Essex England)

Barbituric acid , benzoic acid , disodium hydrogen phosphate 2-hydrate G.R. ,kiesel gel, silica gel G acc. to stahl for thin layer chromatography , potassium dihydrogen phosphate G.R. และ titriplex III G.R.(EDTA disodium salt) (E. Merck A.G. Darmstadt, Germany)

Albumin bovine crystallized , acetic acid glacial analar, chloramine T ,laboratory reagent, potassium iodide, analar, pyridine, sodium azide, laboratory reagent, sodium chloride, labora-

[illegible], laboratory reagent, thiourea [illegible]

tory reagent, sodium hydroxide, laboratory reagent, sodium metabisulphite, laboratory reagent, thiourea spot test BDH reagents, trichroloacetic acid BDH reagents และ o-toluidine laboratory reagent (BDH Chemicals Ltd. Poole, England)

2. เครื่องมือ

2.1. เครื่องมือที่ใช้ในการหาน้ำตาลกลูโคสในเลือด

2.1.1. Cyclo-mixer laboratory mixer (Clay-Adams Inc.)

2.1.2. International clinical centrifuge (Arthur H. Thomas Co. Philadelphia, U.S.A.)

2.1.3. Spectrophotometer spectronic 20 (Bausch and Lomb)

2.2. เครื่องมือที่ใช้ในการทำ radioimmunoassay

2.2.1. Automatic gamma spectrometer Nuclear Chicago model 8741, (Nuclear Chicago, Illinois, U.S.A.)

2.2.2. Expandometric pH meter (Beckman Instruments Inc. California, U.S.A.)

2.2.3. Fraction collector (G.M. Chromatography, Illinois, U.S.A.)

2.2.4. Micro mixer (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, U.S.A.)

2.2.5. Refrigerated centrifuged model PR-6 และ centrifuged model Exd. serial no. A8561X-2 3/4 H.P. (International Equipment Co. Massachusettes, U.S.A.)

2.3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา chromatography

2.3.1. The Dezaga basic equipment for thin layer chromatography (Dezaga Heidelberg, Germany) พร้อมด้วย glass tank

สูง 25 ซม. ฐานมีพื้นที่ 10x25 ตร.ซม. และ glass plate 5x20 ซม.

2.3.2. Radiochromatogram scanner , , Packard model 7201 7201 (Packard , Illinois , U.S.A.)

2.3.2. Sephadex column K 9/15 (0.9x15 ซม.) และ K 15/30 (1.5x30 ซม.) (Pharmacia Fine Chemicals , Uppsala , Sweden)

3. เครื่องแก้ว

Microsyringe ขนาด 10,25,100,250, และ 500 ไมโครลิตร Hamilton Co. Inc. California , U.S.A.)

Micro test tube 10x75 มม.

4. ผู้รับการทดลอง

4.1 คนปกติ เป็นเด็กและวัยรุ่นไทยอายุระหว่าง 7-20 ปี จำนวน 13 คน เป็นชาย 8 คน และหญิง 5 คน ส่วนใหญ่เป็นคนไข้ในโรงพยาบาลศิริราช ทุกคนไม่มีอาการของโรคเกี่ยวกับระบบเอ็นโดไครน์,ตับ และ ไต และไม่ได้อยู่ในสภาวะเครียด (stress)

4.2. คนที่ป่วยด้วยโรคธาลัสซีเมีย เป็นเด็กและวัยรุ่นไทยที่ป่วยด้วยโรคนี้ มีอายุระหว่าง 8-20 ปี จำนวน21 คน เป็นชาย 12คน หญิง 9 คน ทุกคนเป็นคนไข้ในโรงพยาบาลศิริราช แบ่งตามชนิดของโรคได้เป็น

β thal / Hb E	16	คน
β thal major	1	คน
Hb H disease	4	คน

5. การเก็บเลือด

เนื่องจากระดับGH ในร่างกายตามปกติมีค่าต่ำมาก การหาค่า basal level เป็นการยากที่จะวิจารณ์ผล จึงต้องทำการกระตุ้นให้มีการหลั่งเพิ่ม โดยการทำ insulin tolerance test (insulin induced hypoglycaemia)

ผู้รับการทดลองจะต้องงดอาหารและน้ำดื่มตลอดคืนจนถึงเช้า และเริ่มทำการทดลองตั้งแต่ 7.00น.ถึง9.00 น. ผู้รับการทดลองจะต้องนอนอยู่ในเตียงตลอดเวลาการทดลอง

ทำการเจาะเลือดทางเส้นเลือดที่แขน (venepuncture) โดยทำการเจาะทุกครึ่งชั่วโมงติดต่อกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยการให้น้ำเกลือในอัตราที่ช้ามากตลอดการทดลอง โดยมี 3 ways stopcock ต่อก่อนถึงปลายเข็มที่เจาะเพื่อสะดวกในการดูดเลือดครั้งต่อๆไป

เลือดที่เจาะมาศึกษาแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

ก. สำหรับหาปริมาณน้ำตาลในเลือด ใช้เลือดประมาณ 2 มล. ใส่ในขวด NaF แล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปหาปริมาณน้ำตาลทันที่

ข. สำหรับหาปริมาณ HGH ใช้ syringe ที่มี heparin อยู่ภายในดูดเลือดประมาณ 5 มล. จากนั้นนำไปปั่นแยกพลาสมา เก็บแช่แข็งที่ -20c ทันที จนกระทั่งนำมาทำการ assay

การทดลองแบ่งเป็นขั้นๆ ดังนี้

ก่อน 7.00น. เริ่มเก็บ control blood เป็น n_0

7.00 น. ฉีดอินซูลิน 0.15 I.U.ต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม เข้าทางเส้นเลือด

7.30 น. เก็บตัวอย่างเลือดภายหลังการกระตุ้น 30 นาที เป็น n_1

8.00 น. เก็บตัวอย่างเลือดภายหลังการกระตุ้น 60 นาที เป็น n_2

8.30 น. เก็บตัวอย่างเลือดภายหลังการกระตุ้น 90 นาที เป็น n_3

9.00 น. เก็บตัวอย่างเลือดภายหลังการกระตุ้น120 นาที เป็น n_4

ขณะทำการทดลองต้องเตรียมสารละลาย 50% ของกลูโคสไว้ด้วยทุกครั้ง เพื่อที่จะฉีดให้ผู้ป่วยทันทีถ้าผู้ป่วยแสดงอาการ hypoglycemia ถึงขั้นอันตราย และต้องมีแพทย์เฝ้าตลอดการทดลองด้วย

นอกจากนี้ได้ทำการเก็บเลือดจากคนป่วยที่ได้ตัดต่อมพิทูอิตารี่ออกแล้ว ซึ่งควรปราศจาก GH เพื่อใช้ในการทำ percentage recovery เลือดที่นำมาใช้ในการทดลองได้จากคนป่วยซึ่งบริจาคให้เพื่อการทดลองนี้

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมน้ำยา

1.1. น้ำยาสำหรับหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด

1.1.1. สารละลาย3 %TCA ละลาย trichloroacetic acid 3กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

1.1.2. สารละลายสำหรับหาปริมาณกลูโคสในเลือด (0.15 % thiourea , 6 % O-toluidine glacial acetic acid) ละลาย thiourea 1.5 กรัม ใน glacial acetic acid จำนวน1 ลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้นี้จำนวน 940 มล. มาผสมกับ redistilled O-toluidine 60 มล. เก็บในขวดสีน้ำตาลอย่าให้ถูกแสงแดด น้ำยานี้เก็บไว้ใช้ได้นานถึง 2 เดือน แต่เวลาใช้ต้องทำกราฟมาตรฐานเทียบเสมอ

1.1.3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน นำสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 1 กรัม% มาทำให้เจือจางลงด้วย saturated benzoic acid ดังนี้

ก. สารละลายกลูโคส 0.2 มก./มล. นำสารละลายกลูโคสมาตรฐาน จำนวน 1 มล. มาเติม saturated benzoic acid จนมีปริมาตร 50 มล.

ข. สารละลายกลูโคส 0.15 มก./มล. นำสารละลายกลูโคสมาตรฐาน จำนวน 0.75 มล. มาเติม saturated benzoic acid จนมีปริมาตร 50 มล.

ค. สารละลายกลูโคส 0.1 มก./มล. นำสารละลายกลูโคสมาตรฐาน จำนวน 0.5 มล. มาเติม saturated benzoic acid จนมีปริมาตร 50 มล.

ง. สารละลายกลูโคส 0.05 มก./มล. นำสารละลายกลูโคสมาตรฐาน จำนวน 0.25 มล. มาเติม saturated benzoic acid จนมีปริมาตร 50 มล.

1.2. น้ำยาสำหรับหาปริมาณ CH ในพลาสมา

ตลอดการทดลองใช้ double distilled water เป็นตัวทำละลายหรือเจือจาง

1.2.1. สารละลายของ1M KH_2PO_4 จำนวน 1ลิตร ละลาย KH_2PO_4 136.09 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 1000 มล. เก็บไว้เตรียม buffer

1.2.2. สารละลายของ 0.05M KH_2PO_4 จำนวน 1 ลิตร นำสารละลาย 1.2.1. มาทำให้เจือจางลง 20 เท่า โดยนำมา 50 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุทธิเป็น 1000 มล.

1.2.3. สารละลาย 0.5M Na_2HPO_4 จำนวน 1 ลิตร ละลาย $Na_2HPO_4.2H_2O$ จำนวน 88.995 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

1.2.4. สารละลาย 0.05M Na_2HPO_4 จำนวน 1 ลิตร นำสารละลาย 1.2.3. มาทำให้เจือจางลง 10 เท่าโดยนำมา 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุทธิเป็น 1000 มล.

1.2.5. สารละลาย 0.05M phosphate buffer pH 7.5 จำนวน 1 ลิตร นำสารละลาย 1.2.2. และ 1.2.4. มาผสมกันโดยใช้อัตราส่วน 19.6:80.4 จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7.5 (เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4° ซ)

1.2.6. สารละลาย 0.04M KH_2PO_4 จำนวน 100 มล. นำสารละลาย 1.2.1. มา 4 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุทธิเป็น 100 มล.

1.2.7. สารละลาย 0.04M Na_2HPO_4 จำนวน 500 มล. นำสารละลาย 1.2.3. มา 40 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุทธิเป็น 500 มล.

1.2.8. สารละลาย 0.04M phosphate buffer pH 7.4 นำสารละลาย 1.2.6. และ 1.2.7. มาผสมกันโดยใช้อัตราส่วน 40:60 จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7.4 (เก็บไว้ในตู้เย็น)

1.2.9. สารละลาย 0.5M KH_2PO_4 จำนวน 100 มล. นำสารละลาย 1.2.1. มาทำให้เจือจางลง 2 เท่า โดยนำมา 50 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุทธิเป็น 100 มล.

1.2.10. สารละลาย 0.5M phosphate buffer pH7.5 นำสารละลาย 1.2.9. และ 1.2.3. มาผสมกันโดยใช้อัตราส่วน 19.6:80.4 จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7.5 (เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4° ซ) ใช้ในการ iodinate protein

1.2.11. สารละลาย chloramine T (50 ไมโครกรัม ต่อ 10 ไมโครลิตร) ละลาย chloramine T 5มก. ในสารละลาย 1.2.5. 1มล. เตรียมสดก่อนการทดลอง

1.2.12. สารละลาย sodium metabisulphite (240 ไมโครกรัม ต่อ100ไมโครลิตร) ละลาย sodium metabisulphite 2.4 มก. ในสารละลาย 1.2.5. 1มล. เตรียมสดก่อนการทดลอง

1.2.13. สารละลาย potassium iodide (2 มก. ต่อ 200 ไมโครลิตร) ละลาย KI 10 มก. ในสารละลาย 1.2.5. จำนวน 1 มล. เตรียมสดก่อนทำการทดลอง

หมายเหตุ สารละลาย 1.2.11., 1.2.12. และ 1.2.13. ใช้สำหรับการ iodinate โปรตีน

1.2.14. สารละลายที่ใช้ในการเจือจาง (0.04M phosphate buffer pH 7.4 .0,15 % NaCl , 0.1 %NaN_3 และ 2 %CGS) จำนวน 500 มล. ละลาย NaCl 4.3875 กรัม และ NaN_3 0.5 กรัม ในสารละลาย 1.2.8. จำนวน 500 มล. เก็บในตู้เย็นที่ 4 °ซ ก่อนนำมาใช้ในการ assay เติม control guinea-pig serum ลงไป 2 % (V/V)

1.2.15. สารละลาย 0.1M EDTA จำนวน 50 มล. ละลาย EDTA 1.861 กรัม ในสารละลาย 1.2.14. จำนวน 50 มล. เตรียมสดก่อนทำการ

1.2.16. สารละลายของ antiserum ต่อ HGH

ก. มีความเข้มข้นของ Ab 1:2000,000 โดยเจือจาง stock Ab (1:2000) 100 ไมโครลิตร ด้วยสารละลาย 1.2.14. จนมีปริมาตรสุทธิ 10 มล.

ข. มีความเข้มข้นของ Ab 1:4,000,000 โดยเจือจางสารละลาย 1.2.16. ก ลง2 เท่าด้วยสารละลาย 1.2.14.

1.2.17. สารละลาย HGH มาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน I ละลายHGH 5 มก. ในน้ำกลั่น 2.5 มล.(pH ประมาณ 7.2) สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 2 มก. ต่อ มล.

สารละลายมาตรฐานII เจือจางสารละลายมาตรฐาน I ลง4 เท่า ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม ต่อ10 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการ iodinate โปรตีน

สารละลายมาตรฐาน III เจือจางสารละลายมาตรฐาน II ลง 25 เท่า ด้วยสารละลาย 1.2.14. สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร นำไปใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย HGH มาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐาน

1.2,17.1. สารละลาย HGH (32 นก./มล.) เจือจางสารละลายมาตรฐาน III 5 ไมโครลิตร ด้วยสารละลาย 1.2.14. จนมีปริมาตรเป็น 6.25 มล.

1.2.17.2. สารละลาย HGH (16 นก./มล.) เจือจางสารละลาย 1.2.17.1 ลง 2 เท่า ด้วยสารละลาย 1.2.14.

1.2.17.3. สารละลาย HGH (8 นก./มล.) เจือจางสารละลาย 1.2.17.2. ลง 2 เท่า ด้วยสารละลาย 1.2.14.

1.2.17.4. สารละลาย HGH (4 นก./มล.) เจือจางสารละลาย 1.2.17.3. ลง 2 เท่า ด้วยสารละลาย 1.2.14.

1.2.17.5. สารละลาย HGH (2 นก./มล.) เจือจางสารละลาย 1.2.17.4. ลง 2 เท่า ด้วยสารละลาย 1.2.14.

1.2.17.6. สารละลาย HGH (1 นก./มล.) เจือจางสารละลาย 1.2.17.5. ลง 2 เท่า ด้วยสารละลาย 1.2.14.

1.2.17.7. สารละลาย HGH (0.5 นก./มล.) เจือจางสารละลาย 1.2.17.6 ลง 2 เท่า ด้วยสารละลาย 1.2.14.

1.2.18. สารละลาย 2 % BSA ละลาย BSA 30 มิลลิกรัม ในสารละลาย 1.2.5. จำนวน 1.5 มล. นำไปใช้ในการเคลือบผิวในของคอลัมน์ 1 มล. เพื่อไม่ให้โปรตีนถูกดูดติดตามข้างคอลัมน์ และที่เหลือนำไปเติมในหลอดที่เก็บ fraction หลอดละ 0.05 มล. เพื่อไม่ให้โปรตีนติดตามข้างแก้ว

1.3. น้ำยาสำหรับศึกษา characteristics ของ labelled hormone

1.3.1. สารละลายที่ใช้ในการทำ column chromatography (0.05M phosphate buffer pH 7.5., 0.1 % NaN_3) ละลาย NaN_3 0.5 กรัม ในสารละลาย 1.2.5. จำนวน 500 มล. นำไปใช้ในการ pack column และใช้ elute column

1.3.2. สารละลายสำหรับใช้ในการทำ paper chromatography (0.1M barbitone buffer pH 8.6) ละลาย NaOH 7.7 กรัม ในน้ำร้อน จากนั้นเติม barbital (diethyl barbituric acid น้ำหนักโมเลกุล 184.2) จำนวน 41 กรัม ค่อยๆเติมน้ำทีละน้อย นำไปอุ่นจนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 2 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.6 ด้วย NaOH หรือ HCl

(ถ้าใช้ sodium barbitone ไม่ต้องใส่ NaOH ปรับ pH ด้วย HCl)

1.3.3. สารละลายสำหรับทำ thin layer chromatography (n-butanol : H_2O : acetic a : pyridine= 15:12:3:10) เตรียมก่อนใช้ 24 ชั่วโมง โดยผสม n-butanol 45 มล., น้ำกลั่น 36 มล. , glacial acetic acid 9 มล. และ pyridine 30 มล. เข้าด้วยกัน นำไปใส่ใน tank เพื่อ equilibrate tank ก่อนใช้24 ชั่วโมง

2. การหาปริมาณน้ำตาลในเลือด

เพื่อดูว่าการลดของน้ำตาลในเลือดโดยอินซูลินเพียงพอต่อการกระตุ้นการหลั่งของ GH หรือไม่ โดยดำเนินการทดลองตามวิธีการของแพทย์หญิงบุญเรือง นิยมพร และสมพงษ์ องอาจยุทธ (2513) และ Hyvarinen และคณะ (1962) โดยมีหลักการว่า aldohexose ในเลือดจะ condense กับสารละลาย 1.1.2. (หน้า28) ได้ complex ของสารซึ่งมีสีน้ำเงินอมเขียวเกิดขึ้น แต่เนื่องจากระดับน้ำตาลกาแลคโตสในเลือดมีค่าคงที่ คือ ประมาณ 3 มก.% ดังนั้นค่าน้ำตาลที่วัดได้โดยวิธีนี้จึงถือว่าเป็นค่าของน้ำตาลกลูโคสที่แท้จริงได้

การทดลองทำเป็นขั้นๆดังนี้ คือ

1. ใช้ oswald pipette ปิเปตเลือด 0.5 มล. ใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาดจุ 15 มล. เติมสารละลาย 1.1.1.(หน้า 28) จำนวน 4.5 มล. ลงไปเพื่อตกตะกอนโปรตีนต่างๆที่มีอยู่ในเลือด นำไปเขย่าให้เข้ากันโดยใช้ cyclo mixer เป็นเวลา 1นาที

2. นำไปปั่นในเครื่องเซนตริฟิวซ์ เพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนใส

3. ดูดส่วนใส 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดใหม่ และเติมสารละลาย 1.1.2. (หน้า 28) 4.5มล. เขย่าให้เข้ากัน

4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที จะได้สารละลายที่มีสีน้ำเงินแกมเขียวเกิดขึ้น

5. นำไปวัดค่า O.D. โดยใช้ spectronic 20 โดยใช้ red filter วัดที่ 630 nm

ค่า O.D. ที่ได้นำไปคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาล โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งทำขึ้นจากสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน กราฟมาตรฐานนี้ถ้าน้ำยามีอายุเกิน 1 เดือนต้องทำขึ้นใหม่ เพราะค่าที่ได้จะลดต่ำลงจากเดิม เนื่องจากประสิทธิภาพของน้ำยาต่ำลง หรืออาจทำสารละลายกลูโคสมาตรฐานเทียบทุกครั้งที่ทำการทดลอง

ในการทดลองต้องมี

blank ประกอบด้วย น้ำกลั่น 5 มล.

control ประกอบด้วย สารละลาย 1.1.1. 0.5 มล. และสารละลาย 1.1.2. 4.5 มล.

ก่อนนำค่าที่ได้มาคำนวณ ต้องหักค่า O.D.ที่อ่านค่าได้จากค่า control เสียก่อน

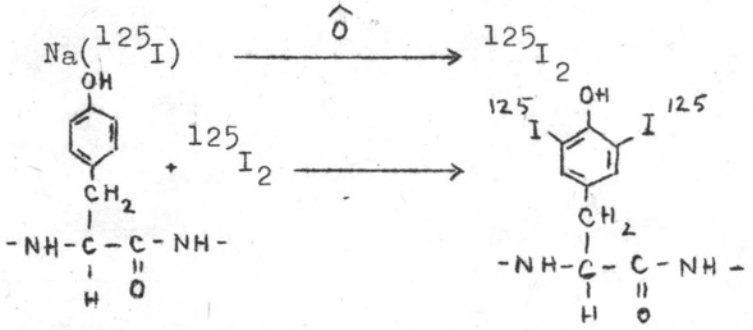
3. <u>การหาปริมาณโกรธฮอร์โมนในพลาสมา</u>

3.1. <u>การ iodinate GH (iodination)</u>

ในโมเลกุลของโปรตีน ไทโรซีน (tyrosine, Tyr) เป็นกรดอะมิโนที่สำคัญใน process of iodination รองลงมาคือ ฮีสติดีน (histidine,His) แต่จำนวน Tyr ในโมเลกุลของโปรตีนนั้นเป็นแฟคเตอร์สำคัญที่จำกัดต่อการที่ radioactive I_2 จะ incorporate เข้าไปในอณูของโปรตีน เพราะโปรตีนแต่ละชนิดมีจำนวน Tyr ต่างกันไป เช่น HGH มี 8 ตัว , อินซูลินมี 4 ตัว ดังนั้น iodination of protein แต่ละชนิดจึงแตกต่างกันไป

วิธี iodinate โปรตีนใช้ปฏิกริยาออกซิเดชั่น ซึ่งมีหลายวิธี แต่ละวิธีจำเป็นต้องมีการเตรียมไอโอไดด์ (iodide, I^-) ให้มี specific radioactivity สูง และเป็น carrier free-isotope ด้วยจึงจะสามารถทำให้ labelled hormone นั้นมี specific radioactivity สูงด้วย และมีปฏิกิริยาแทนที่ทางเคมีต่ำ (โดย

ไอโอไดด์จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นไอโอดีน(I_2) ปฏิกริยาระหว่างไอโอไดด์กับโปรตีนแสดงดังรูป



ฮอร์โมนที่ถูก label จะนำไปแยกออกจาก damage protein ที่เกิดจากปฏิกริยา iodination และ free I^- ที่เหลืออยู่ โดยวิธี fractionation โดยการผ่าน sephadex column

การ iodinate โปรตีนมีอยู่หลายวิธี แต่ละวิธีก็ต่างกันเนื่องจากการใช้ oxidising agent ต่างๆกัน คือ

1. ใช้ nitrous acid ทำการ label กลูคากอน (Probst และCowel, 1966)

2. ใช้ iodine monochloride label อินซูลิน (Hale และRandle, 1963; Izzo และ คณะ, 1964)

3. ใช้ chloramine T label HGH (Hunter และGreenwood, 1962a; Greenwood และ คณะ, 1963)

4. ใช้ enzyme lactoperoxidase (Marchalonis, 1969; Morrison และ คณะ, 1971) และวิธีที่ดัดแปลงโดย Thorell และ Johansson (1971) และพบว่ามีปฏิกริยารุนแรงน้อยกว่าวิธีที่ 3

5. วิธี gaseous diffusion of oxidant (Butt, 1972)

6. วิธี conjugation labelling (Bolton และ Hunter, 1972; 1973) โดยโปรตีนที่จะทำการไอโอดิเนตไม่ต้องนำมาให้สัมผัสโดยตรงกับออกซิไดส์ซึ่งรีเอเจนต์ แต่นำมาสัมผัสกับ acyl group ที่ทำการไอโอดิเนตแล้ว แต่ผลที่ได้จากวิธีนี้จะต่างจากผลของวิธีอื่นๆ

ได้ทำการ label HGH ด้วย $Na^{125}I$ ซึ่งเป็นวิธีของ Greenwood และ คณะ (1963) แต่นำมาดัดแปลงต่อโดย Kirgham และ Hunter (1971) โดยใช้ $Na^{125}I$ แทน ^{131}I เพื่อให้ได้ specific activity ที่สูงกว่าเดิม และใช้ได้นานกว่า ทั้งนี้เพราะ half life ของ ^{125}I ยาว (45 วัน)กว่า ^{131}I (8 วัน)มาก

การ label HGH ทำเป็นขั้นๆ ดังนี้ คือ

1. ใช้ vial บรรจุ $Na^{125}I$ 1 มิลลิคิวรี่ ใน 10 ไมโครลิตร

2. เติมสารละลาย 0.5M phosphate buffer pH 7.5 (ตามข้อ 1.2.10. หน้า 29) จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงใน vial

3. เติมสารละลาย HGH มาตรฐาน 5 ไมโครกรัม ต่อ 10 ไมโครลิตร (ตามข้อ 1.2.17. หน้า 30) จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงใน vial แล้วนำไปเขย่าให้สารละลายผสมกันทั่วด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 นาที

4. เติมสารละลาย chloramine T (ตามข้อ 1.2.11. หน้า 29) จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงใน vial นำไปเขย่าให้สารละลายผสมกันทั่วด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลานาน 1 นาที เพื่อให้ chloramine T ทำปฏิกริยาออกซิไดส์ $Na^{125}I$ ให้เป็น free $^{125}I_2$ ซึ่งจะเข้าแทนที่ไฮโดรเจนไอออน(H^+)ใน Tyr ของโมเลกุลของ HGH

5. เติมสารละลาย sodium metabisulphite (ตามข้อ 1.2.12. หน้า 30) จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงใน vial ทันทีเพื่อหยุดปฏิกริยาออกซิไดส์ และจะเกิดปฏิกริยารีดิวซ์ โดย free $^{125}I_2$ จะถูกรีดิวซ์กลับไปเป็น I^- นำไปเขย่าในเครื่องเขย่านาน 1 นาที เพื่อให้ปฏิกริยาออกซิไดส์หมดแน่นอน

6. เติมสารละลาย KI (ตามข้อ 1.2.13. หน้า 30) จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในvial เพื่อล้าง free $^{125}I_2$ ให้หมดไป

7. จากนั้นนำสารละลายที่ได้ผ่านลงในคอลัมน์ของ sephadex G-50 (0.9 x 15 ซม.) เพื่อแยกโปรตีนที่ถูก label ออกจาก damaged protein และ iodide (salt)peakจากนั้นล้าง vial ด้วยสารละลาย KI (1.2.13) จำนวน 400 ไมโครลิตร นำผ่านคอลัมน์ด้วย

17473639

8. แยกเก็บสารละลายที่ผ่านจากคอลัมน์เป็นส่วนๆ ส่วนละ 0.5 มล. โดยให้อัตราการไหลของสารละลายเท่ากับ 1 มล. ต่อ 1.5 นาที

9. นำสารละลายแต่ละส่วนที่ได้นั้น แบ่งมา 5 ไมโครลิตรนำไปนับหาปริมาณกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่อง automatic gamma spectrometer เพื่อหาprotein peak และ salt peak ต่อไป และนำมาคำนวณ specific activity เพื่อใช้หาปริมาณ labelled hormone ที่ใช้ในการทดลองต่อไป

3.2. การหา homogeniety ของ labelled hormone

นำ labelled hormone ที่ได้มาทำการศึกษาต่อเพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ โดยทำตามวิธีของ Stadil และ Rehfeld (1968) คือทำ chromatography 2 แบบ โดย

ก. ผ่าน thin layer chromatography

ข. ผ่าน paper chromatography

เพื่อดูว่าฮอร์โมนที่ทำการ label นั้น ภายหลังการ label จะได้ฮอร์โมนที่บริสุทธิ์หรือไม่ และก่อนนำไปใช้ต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ sephadex G-100 ก่อนทุกครั้ง เพราะ labelled hormone จะมีการสลาย (degradation)ตลอดเวลา

3.3. การทำ antibody titration curve

เพื่อหาปริมาณของ Ab และ Ag^* ที่เหมาะสมในการทำ assay ครั้งต่อไป การทดลองมี 2 ขั้น คือ

first antibody reaction แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ

ก. ใช้ Ag^* ที่มีความเข้มข้น 25 พิโคกรัม ต่อ หลอดทดลอง

ข. ใช้ Ag^* ที่มีความเข้มข้น 50 พิโคกรัม ต่อ หลอดทดลอง

ทั้ง 2 กลุ่มใช้ Ab ที่มีความเข้มข้นต่างๆกันเรียงตามลำดับ คือ

ก. Ab ต่อ HGH เจือจาง 1:100,000

ข. Ab ต่อ HGH เจือจาง 1:200,000

ค. Ab ต่อ HGH เจือจาง 1:400,000

ง. Ab ต่อ HGH เจือจาง 1:800,000

second antibody reaction เพื่อศึกษาว่าการตกตะกอนด้วย $2^{nd}Ab$ นี้จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ $2^{nd}Ab$ จำนวนเท่าใด จึงแบ่งการทดลองออกเป็นใช้ goat anti guinea-pig gamma globulin 2 แบบ คือ

ก. เติม $2^{nd}Ab$ 25 ไมโครลิตร ต่อหลอดทดลอง

ข. เติม $2^{nd}Ab$ 50 ไมโครลิตร ต่อหลอดทดลอง

ข้อ 4. Assay proper

การ assay HGH (assay proper) โดยวิธี RIA ทำเป็นขั้นๆ ดังนี้

1. first Ab reaction เมื่อเติม reaction mixture ครบแล้ว นำไปอินคิวเบทที่ 4°ซ เป็นเวลา 1 วันก่อนเติม Ag^* จากนั้นนำไปอินคิวเบทที่ 4°ซ ต่ออีก 5 วัน จะเพิ่มความไวในการวัด GH

2. second Ab reaction เมื่อครบ 5 วันแล้ว เติม $2^{nd}Ab$ แล้วนำไปอินคิวเบทต่อที่ 4°ซ อีก 24 ชั่วโมง

3. วัด radioactivity (total count) ด้วยเครื่อง spectrometer ในแต่ละหลอดทดลองโดยสุ่มตัวอย่างออกมาประมาณ 20 หลอด เพื่อดูความแม่นยำในการเติม Ag^* ในแต่ละหลอด และเพื่อใช้ในการคำนวณอื่นๆต่อไป

4. นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4°ซ ด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดส่วนใสข้างบนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ซึ่งประกอบไปด้วย Ag^*-Ab และ Ag-Ab complex + anti gamma globulin ไปนับหาปริมาณกัมมันตภาพรังสี Ag^*-Ab complex นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซนต์ของการแข่งขันรวมตัว

เมื่อเตรียมสารเคมีทุกอย่างพร้อมแล้วจึงนำมาทำปฏิกริยา ในแต่ละหลอดทดลองจะประกอบไปด้วย 1^{st} antibody reaction mixture ดังนี้

1. 0.04 M phosphate buffer pH 7.4 0.15M NaCl, 0.1% NaN_3 2% CGS (ตามข้อ 1.2.14. หน้า 30) 0.1 มล.

2. 0.1 M EDTA (ตามข้อ 1.2.15. หน้า 30) 0.1 มล.

3. standard HGH หรือ unknown plasma 0.1 มล.

4. Abต่อ HGH ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ตามที่เลือกมาได้จากการทำ antibody titration curve คือ 1:400,000 · 0.1 มล.

นำไปอินคิวเบทที่ 4°ซ 24 ชั่วโมง

5. Ag^* 0.1มล. (จากการทำ Ab titration curve เลือก Ag^* 25พิโคกรัม ต่อหลอดทดลอง มาใช้)

total volume เท่ากับ 0.5 มล. นำไปอินคิวเบทที่ 4°ซ 5 วัน

สำหรับ 2^{nd}Ab reaction mixture นั้นเติม 2^{nd} Ab ปริมาณที่เหมาะสมตามที่เลือกมาได้จากการทำ Ab titration curve คือ 50 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง

โดยทำ blank tube เพื่อหาค่า non specific reaction ในหลอดนี้จะไม่มี Ab ต่อ HGH, standard HGH หรือ unknown plasma

และ control tube เพื่อดูการรวมตัวของ Ag^* กับ Ab โดยปราศจาก Ag คือไม่มี competitive inhibition reaction

ส่วน standard tube เติม standard HGH ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

และ unknown tube เติม unknown plasma แทน standard

การ assay HGH นี้ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Hunter และ Greenwood (1962 , 1964); Utiger และ คณะ (1962); Glick และ คณะ (1963); Hartog และ คณะ (1964) ; Cerasi และ คณะ(1966) และ Morgan (1966) แต่ได้นำมาดัดแปลงใช้ตามวิธีของ Crawley และ คณะ (1973) ซึ่งทำใน heparinized blood และมี EDTA ในreaction mixture ด้วย เช่นเดียวกับ Morgan และ คณะ (1964); Sheldon และ Taylor (1965) และ Aynsley-Green และ Alberti (1972) ซึ่งได้ใช้ EDTA ในการ assay ของอินซูลิน เพราะ EDTA จะมีฤทธิ์เป็น anti complement และมีผลต่อการเพิ่มอัตราการตกตะกอนของ Ab และเพิ่มอัตราการนอนก้นของAg^*-Ab-2^{nd}Ab complex ในตอนเซนตริฟิวซ์เพื่อแยกออกจาก free Ag^*

3.5. การหาระยะเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท ถึงแม้ว่าการ assay HGH นั้นมีวิธีการที่เป็นที่ยอมรับกันมานานแล้ว แต่เพื่อดูว่าสภาวะเหล่านั้นเหมาะกับการทดลองที่เราจะทำหรือไม่ จึงต้องทำการทดลองเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการ assay โดยการทำกราฟมาตรฐานโดยทำในระยะเวลาการอินคิวเบทต่างๆกัน คือ ทำการอินคิวเบทที่ 4 °ซ เป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วันหลังจากเติม Ag^* จากผลที่ได้เลือกเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบทที่ได้กราฟมาตรฐานที่มีเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัว (competitive binding) สูงพอเหมาะ มีความชันสูงที่สุด และใช้เวลาน้อยที่สุดมาใช้ในการ assay ครั้งต่อๆไป

3.6. การทำกราฟมาตรฐานในการ assay HGH การทำการ assay ของHGH นั้นต้องทำกราฟมาตรฐานทุกครั้ง เพื่อใช้เป็นสิ่งเปรียบเทียบในการวัดปริมาณฮอร์โมนในพลาสมาตัวอย่าง กราฟมาตรฐานในการทำ RIA นั้นจะต้องมีช่วงกว้าง (wide range)พอประมาณ และเป็นกราฟที่มีความชันสูง และมีเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัวของ Ag^* กับ Ag พอเหมาะด้วย แต่ทั้งนี้ต้องเนื่องมาจากปริมาณ Ag^* และAb ที่ใช้ด้วย ถ้าวิธีการที่ทำมีความไวในการวัดสูง ช่วงของกราฟมาตรฐานที่จะอ่านค่าฮอร์โมนได้จะมีค่าต่ำ ใช้อ่านได้ถึงปริมาณฮอร์โมนที่มีค่าต่ำมากๆ จึงสะดวกในการวัดหาฮอร์โมนที่มีปริมาณน้อยมาก

ทำกราฟมาตรฐานโดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5 โดยประกอบด้วยสารดังกล่าวในข้อ 3.4 (หน้า 37) โดยให้มี total count ของ Ag^* ประมาณ 3000 cpm (25 พิโคกรัม/หลอด) ในการทำการ assay ทำ duplicate ทุกหลอดยกเว้น blank และ control ทำ triplicate และปริมาณฮอร์โมนที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานคือ สารละลาย HGH 0.25,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 และ 16.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ตามข้อ 1.2.17. หน้า 30)

จากเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัวที่ได้นำไปเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซนต์ของการแข่งขันรวมตัว กับlog ของความเข้มข้นของHGH จากกราฟนี้เลือกกราฟส่วนที่มีความชันเท่านั้นที่จะนำไปอ่านค่าฮอร์โมนในพลาสมา

3.7. การหาปริมาณ HGH ในพลาสมา ปริมาณเลือดที่ใช้ในการ assay ฮอร์โมนนั้น จำเป็นต้องให้มีค่าของฮอร์โมนอยู่ในกราฟมาตรฐานช่วงที่ใช้อ่านค่าได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเจือจางพลาสมาลงถ้าคิดว่าจะมีปริมาณฮอร์โมนสูง ด้วยสารละลายที่

ใช้เจือจาง (ตามข้อ 1.2.14. หน้า 30) แต่ฮอร์โมนในพลาสมานั้นมีค่าต่ำกว่าช่วงที่ใช้อ่านค่าของกราฟ จำเป็นต้องใช้ปริมาณพลาสมาเพิ่มขึ้นเพื่อให้ได้ปริมาณฮอร์โมนที่จะอ่านจากกราฟได้ เนื่องจากการทดลองสำหรับ HGH นี้เป็นการทำ stimulation test ดังนั้นปริมาณฮอร์โมนภายหลังการกระตุ้นควรสูงขึ้นกว่าตอนแรก จึงต้องเจือจางพลาสมาลง

การหาปริมาณฮอร์โมนในพลาสมา ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.6 (หน้า 39) แต่เติมพลาสมาแทนสารละลาย HGH มาตรฐาน จะใช้พลาสมาเท่าใดก็ได้ แต่ต้องมี total volume เท่าเดิม และต้องทำกราฟมาตรฐานไว้เทียบทุกครั้งที่ทำการทดลอง เพราะสภาพของการทดลองแต่ละครั้งอาจจะไม่เหมือนกัน

ในการทดลองได้ทำการเจือจางพลาสมาโดยทำให้เจือจางลงตั้งแต่ 2, 5, 10 และ 20 เท่า โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของพลาสมาและ buffer เท่านั้น นอกนั้นใช้ปริมาตรเท่าเดิม

จากเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัวที่ได้ นำไปเขียนกราฟมาตรฐานขึ้น และอ่านค่าปริมาณฮอร์โมนจากพลาสมาโดยอ่านค่าเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานนั้น ค่าที่ใช้ได้จะต้องอ่านจากกราฟมาตรฐานในช่วงที่มีความชันเท่านั้น

3.8. <u>การหา percentage recovery</u> ของการทดลอง เพื่อศึกษาว่าการทดลองนี้สามารถนำมาใช้หาปริมาณฮอร์โมนได้โดยมีความแม่นยำเพียงใด จึงทำการทดลองหาเปอร์เซนต์ในการ recover ฮอร์โมน โดยการใช้ pooled serum ของผู้ที่ทำการตัดต่อมพิทูอิตารี่ออกแล้ว ซึ่งเป็นที่คาดได้ว่าจะไม่มีปริมาณของ GH เหลืออยู่หรือมีปริมาณต่ำ และเมื่อเติมสารละลายมาตรฐาน ที่ทราบค่าแน่นอนลงไป ก็ยังคงมีปริมาณฮอร์โมนอยู่ในกราฟมาตรฐานช่วงที่ใช้อ่านค่าได้

ปริมาณ HGH ที่เติมลงไปเพื่อทำการหา percentage recovery นั้นแบ่งเป็น

ก. ค่าต่ำ คือเติมสารละลาย HGH 0.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ข. ค่ากลาง คือเติมสารละลาย " 1.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ค. ค่าสูง คือเติมสารละลาย " 2.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

และต้องทำการหาปริมาณฮอร์โมนใน pooled serum เทียบควบคู่ไปด้วยเสมอ

4. การศึกษา characteristics และ property ของ labelled HGH

เพื่อศึกษาว่าภายหลังการ label แล้ว คุณภาพในการเป็นแอนติเจนและคุณลักษณะของการเป็น labelled hormone จะเปลี่ยนแปลงไปได้อย่างไรบ้าง จึงนำ Ag* (HGH*) มาทำการศึกษาภายหลังการ label ได้ 1, 2, 3, 4และ 5 อาทิตย์ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ขั้น คือ

ก. ศึกษาด้วย chromatography โดยแบ่งเป็น

column chromatography

thin layer chromatography

paper chromatography

ข. หาเปอร์เซนต์การรวมตัวของ Ab กับ ^{125}I-HGH ภายหลังจากการทำ column chromatography แล้ว นำแต่ละ peak ที่ได้มาหาเปอร์เซนต์การรวมตัว เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การรวมตัวที่ได้จากฮอร์โมนที่ labelแล้วที่มีอายุต่างๆกัน

ทำการทดลองดังการทดลองที่ 4.1-4.3 ในการศึกษาทุกอย่างและทุกครั้ง นำ Ag* ในแต่ละ peak มาใช้ 10 ไมโครลิตร ตลอดการทดลอง และ pool ทุกส่วนของ peak ที่ได้จากการทำ column chromatography มาใช้ในการหาเปอร์เซนต์การรวมตัว โดยให้ total count มีค่าประมาณ 3000 cpm

หมายเหตุ เนื่องจาก 2nd Ab หมดจึงไม่ได้ทำการศึกษาเปอร์เซนต์การรวมตัวในอาทิตย์สุดท้าย และในอาทิตย์หลังๆไม่ได้ทำ thin layer chromatography เพราะพบว่าแยกไม่ได้ชัดเหมือนกับอีก 2 วิธี

4.1. การทำ column chromatography

Sephadex G-50 column (0.9x15ซม.) แช่ sephadex G-50 3 กรัมในน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.05M phosphate buffer pH 7.5 ซึ่งมี 0.1 % NaN_3 (ตามข้อ 1.3.1. หน้า 31)2-3 ครั้ง แล้วนำไปไล่อากาศออกโดยการอุ่น และใช้เครื่องดูดอากาศ จากนั้นนำไป pack ลงในคอลัมน์ที่อุณหภูมิประมาณ 25 °ซ โดยเคลือบคอลัมน์ด้วยสารละลาย 2% BSA (ตามข้อ 1.2.18. หน้า 31)ก่อน และใช้สารละลาย 0.05M phosphate buffer pH 7.5 เป็น eluent ด้วยอัตราความเร็ว 24 มล./ช.ม.

Sephadex G-100 column (1.5x30 ซม.) แช่ sephadex G-100 5 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล. เป็นเวลา 3 วัน แล้วล้างด้วยสารละลายตามข้อ 1.3.1. หน้า31 2-3 ครั้ง และนำไป pack ลงในคอลัมน์ เช่นเดียวกับ pack sephadex G-100 column

เมื่อ apply สารที่ต้องการศึกษาลงในคอลัมน์แล้ว ทำการเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์เป็นส่วนๆ ส่วนละ 1 มล. โดยเติม 2 % BSA ลงในหลอดทดลองหลอดละ 0.05 มล. หรือเติมสารละลายตามข้อ 1.3.1. (หน้า 31) ลงแทน

4.2. การทำ paper chromatography ตัดกระดาษกรอง whatman no. 2 ขนาด 2 x 16ซม. apply สารที่ต้องการศึกษาลงบนปลายด้านหนึ่งของกระดาษจุ่มปลายกระดาษด้านนี้ลงใน petri dish ซึ่งมีสารละลาย 0.1 M barbitone buffer pH 8.6 (ตามข้อ 1.3.2.หน้า 32)อยู่ ตั้งทิ้งไว้ (พยายามทำให้เป็น closed system) ปล่อยให้ buffer ซึมไปบนกระดาษตามยาวจนเกือบสุดกระดาษ ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่ 60 °ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไป scan ด้วยเครื่อง radiochromatogram scan

4.3. การทำ thin layer chromatography

4.3.1. การเท plate นำ silica gel G 30 กรัมมาเขย่ากับน้ำกลั่นจำนวน 60 มล. เป็นเวลาหนึ่งนาทีครึ่ง แล้วเทลงบนแผ่นกระจกขนาด 5 x 20 ซม. ให้หนา 75 มม. ทิ้งไว้ให้หมาด แล้วนำไปอบที่ 110 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ต้องนำไปอบใหม่อีกประมาณ 1 ชั่วโมง

4.3.2. การ equilibrate tank นำสารละลายที่ใช้ในการทำ thin layer chromatography (ตามข้อ 1.3.3. หน้า 32) ที่ผสมกันดีแล้วเทลงใน tank ขนาดสูง 25 ซม. มีฐานขนาด 10 x 25ซม. แล้วปิดฝาให้แน่น ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงก่อนใช้

4.3.3. การ apply sample apply สารที่จะศึกษาลงกลางที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง จากนั้นนำไปใส่ใน tank โดยเอียงปลายด้านที่ไม่ได้ apply สารให้ติดกับผนัง tank ส่วนอีกปลายหนึ่งจุ่มอยู่ในสารละลายใน tank ทิ้งไว้ 4 ชม. ปล่อยให้สารละลายซึมไปตาม plate จนเกือบสุด plate แล้วจึงยก plate ออกปล่อยให้แห้ง นำไป scan โดยเครื่อง radiochromatogram scanner

5. การคำนวณ

5.1. การหา specific activity ของ labelled hormone

ทำการคำนวณดังนี้

ให้ปริมาณรังสีที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด = A cpm

= 1 มิลลิคิวรี่

และมีปริมาณ GH อยู่ = 5 ไมโครกรัม

ปริมาณรังสีที่ผ่านเข้าคอลัมน์ทั้งหมด = B cpm

และปริมาณรังสีที่วัดได้ใน peak ของโปรตีน = C

∴ ปริมาณรังสีใน protein peak = $\frac{C}{A}$ มิลลิคิวรี่

และปริมาณ GH ใน protein peak = $5\ \frac{B}{A}$ ไมโครกรัม

= $\frac{C}{A}$ มิลลิคิวรี่/ $5\ \frac{B}{A}$ ไมโครกรัม

= $\frac{C}{5B} \times 1000$ ไมโครคิวรี่/ไมโครกรัม

และเปอร์เซนต์การไอโอดิเนต = $100 \times \frac{C}{B}$ %

จากค่า specific activity ที่ได้นำไปคำนวณหาปริมาณ Ag* ที่จะใช้ในการ assay ต่อๆไป โดยคิดคำนวณดังนี้

จาก specific activity = $\frac{C \times 1000}{5B}$ ไมโครคิวรี่/ไมโครกรัม

และปริมาณรังสีใน protein peak = C cpm

∴ ปริมาณ โปรตีนใน protein peak = $\frac{5B}{A}$ ไมโครกรัม

ถ้าต้องการ Ag* ในหลอดทดลอง = X ไมโครกรัม

แต่เนื่องจากโปรตีนจำนวน $\frac{5B}{A}$ ไมโครกรัม อยู่ในโปรตีนที่มีปริมาณรังสี C cpm

∴ โปรตีนจำนวน X ไมโครกรัมจะอยู่ในโปรตีนที่มีปริมาณรังสี $\frac{CXA}{5B}$ cpm

ดังนั้นในการ assay ครั้งต่อไปจะใช้ Ag* ที่มีปริมาณรังสี $\frac{CXA}{5B}$ cpm

5.2. การคำนวณหาเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัว(competitive binding)

ให้ปริมาณรังสีทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง(total count) = T cpm

ให้ปริมาณรังสีที่อ่านได้จาก blank tube = B cpm

ให้ปริมาณรังสีที่อ่านได้จาก control tube = C cpm

ให้ปริมาณรังสีที่อ่านได้จาก standard tube = S cpm

ให้ปริมาณรังสีที่อ่านได้จาก unknown tube = U cpm

เปอร์เซนต์การรวมตัวของ control = C cmp

ให้เปอร์เซนต์ของการรวมตัวของ control คิดเป็นเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัว (competitibe binding) = 100

ดังนั้นเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัวของ standard $= \frac{S-B}{C-B} \times 100$ %

และเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัวของ unknown $= \frac{U-B}{C-B} \times 100$ %

จากค่าเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัวที่ได้นำไปอ่านปริมาณฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐานได้

5.3. การหา percentage recovery

ให้ปริมาณฮอร์โมนใน pooled serum = B นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ให้ปริมาณฮอร์โมนที่เติม = A นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ให้ปริมาณฮอร์โมนที่สกัดได้ภายหลัง = C นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้นปริมาณฮอร์โมนที่ recover ได้ = C-B นาโนกรัม/มิลลิลิตร

หรือ B-C นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้น percentage recovery $= \frac{C-B}{A} \times 100$ %

หรือ $\frac{B-C}{A} \times 100$ %

5.4. การคำนวณหาความไวในการวัด(sensitivity)ของการทดลอง

ทำการคำนวณตามวิธีของ Ekins และ Newman (1970) โดย

ความไวในการวัด $= \frac{\text{ความแตกต่างทางสถิติ}}{\text{ความชัน}}$

ความแตกต่างทางสถิติ (statistical error) ทำการคำนวณได้ดังนี้

1. หาอัตราส่วน F/B ของกราฟมาตรฐาน แต่ละจุด และหาค่าเฉลี่ย

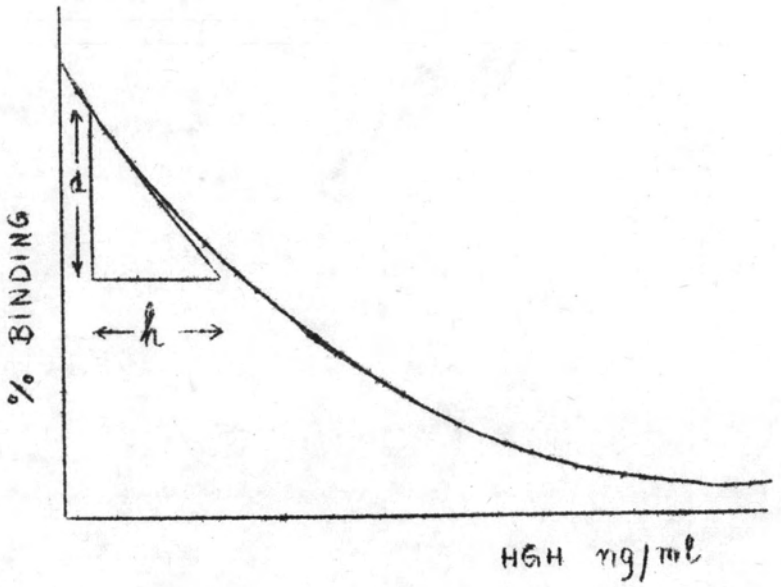
2. หาเปอร์เซนต์ความแตกต่างทางสถิติ และหาค่าเฉลี่ย จะได้ค่าเปอร์เซนต์ความแตกต่างทางสถิติเฉลี่ย

การหาความชัน (slope) ของกราฟมาตรฐานทำดังนี้

1. เขียนกราฟระหว่างเปอร์เซนต์การแข่งขันรวมตัวกับความเข้มข้นของHGH เป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้กราฟธรรมดา

2. หาความชันของกราฟ (จากรูป) ที่จุดต่ำสุดจากสูตรการหาความชัน

ความชัน $= \frac{d}{h}$



5.5. การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด

ถ้าทำกราฟมาตรฐานไว้ก็อ่านค่าจากกราฟได้ทันที แต่ถ้าทำ standard เทียบทุกครั้งให้คำนวณดังนี้

คือ $\frac{Cu}{Cs} = \frac{Au}{As}$

เมื่อ Cu คือ ความเข้มข้นของ unknown เป็น มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

Cs คือ ความเข้มข้นของ standard เป็น มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

Au คือ optical density ของ unknown ที่อ่านได้

As คือ optical density standard ที่อ่านได้

การหาเปอร์เซนต์การลดลงของระดับน้ำตาลในเลือด ทำดังนี้

ให้ระดับน้ำตาลในเลือดก่อนฉีดอินซูลิน (n_0) = A มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

ให้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังการฉีดอินซูลิน ที่มีค่าต่ำสุด = B มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

ระดับน้ำตาลลดลง = A-B มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

ระดับน้ำตาลลดลงคิดเป็นเปอร์เซนต์ = $\frac{A-B}{A} \times 100$ %

5.6. การคำนวณหาความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และ ความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่ม (student t test)

ให้ค่าที่อ่านได้จากการทดลอง = X หน่วย

จำนวนครั้งของการทดลอง = n ครั้ง

ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) = $\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$

deviation of mean (d_i) = $X_i - \bar{X}$

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

ถ้า $n > 30$ ใช้ n แทน $(n-1)$

standard error (S.E.) = $\frac{S.D.}{\sqrt{N-1}}$

student t test = $\frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\Delta p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$

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