หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

สัตว์ทดลอง สารเคมี อุปกรณ์และการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ใช้สัตว์ทดลอง 3 ชนิดคือ

1. หนูขาว (Albino rat) (Rattus norvigicus) พันธุ์วิสตาร์ เพศผู้อายุ 23-25 วัน เพื่อใช้เซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้ามาเพาะเลี้ยง

2. หนูไมซ์ (Mice) พันธุ์สวิส เพศผู้อายุ 28 วัน เพื่อใช้ Leydic cell จากอัณฑะในการตรวจหาไบโอแอคติวิตีของ rLH (Bioassay rLH)

3. ลิงหางยาว (Macaca fascicularis) อายุ 1-13ปี ทั้งเพศผู้และเพศเมีย เพื่อนำเอา ซีรัมมาใช้ในการทดลอง

สถานที่เลี้ยง หนูขาวและหนูไมซเลี้ยงในเรือนเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งปรับอากาศให้อุณหภูมิห้องประมาณ 25 °ซ. และควบคุมแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง ระหว่างเวลา 06.00-20.00 น. ด้วยเครื่องควบคุมอัตโนมัติ พร้อมทั้งให้อาหารและน้ำดื่มตลอดเวลา ส่วนลิงหางยาวเลี้ยงในเรือนเลี้ยงลิงของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลิงแต่ละตัวเลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิม ขนาดของกรงกว้าง 24 นิ้ว สูง 34 นิ้ว และลึก 28 นิ้ว เรือนเลี้ยงลิงกรุด้วยลวดตาข่ายและมุ้งลวด และยังมีพัดลมดูดอากาศ จึงทำให้อากาศถ่ายเทได้สะดวกเหมือนสภาพธรรมชาติ อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารหลักเป็นอาหารสำเร็จรูปของบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ และอาหารเสริมเป็นจำพวกกล้วย มันเทศ แตงกวา สับปะรดและผักต่างๆ โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00 - 9.00 น. และ 15.00 - 16.00 น. นอกจากนี้ยังให้ไข่ต้มสัปดาห์ละ 1 ฟองต่อตัว

ห้องปฏิบัติการ

1. เรือนเลี้ยงหนูและเรือนเลี้ยงลิงของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. ฮอร์โมน

1.1 Testosterone standard : Batch no. 83/N, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland.

1.2 Rat luteinizing hormone antigen : NIADDK-rLH-I-6(AFP-6833C), Pituitary Hormone & Antisera Center California, U.S.A.

1.3 Rat luteinizing hormone : NIADDK-rLH-RP-2 (AFP5666C), Pituitary Hormone & Antisera Center California, U.S.A.

1.4 Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH, หรือ GnRH) : (p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2-2ACOH, NO. L-0507, Mol. Wt. 1302.4, Sigma Chemical Company, U.S.A.

2. แอนติบอดี

2.1 Antiserum to testosterone : Batch NO. 81/F, WHO/RIA Reagent Programme, Switzerland.

2.2 Antiserum to rat luteinizing hormone (First antibody) : NIADDK-anti-rLH-S-8, Pituitary Hormone & Antiserum Center California, U.S.A.

2.3 Anti-rabbit IgG (Whole molecule) (Second antibody) : Lot 54F-8835, Sigma Chemical Company, U.S.A.

3. สารกัมมันตรังสี

3.1 (1,2,6,7-^{3}H) testosterone : Batch No. B54, Amersham International plc, England

3.2 $Na^{125}I$: Batch No. 48B, Amersham International plc, England

4. สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาว

4.1 Minimum Essential Medium (MEM) : Cat. No. 410-1100, Grand Island Biological Company, U.S.A.

4.2 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : No. 430-1600, Gibco Laboratories, Life technologies, inc. U.S.A.

4.3 N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethaesulfonic acid (HEPES) : No. H-3375, Sigma Chemical Company, U.S.A.

4.4 sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) : E. Merck, Darmstadt, Germany

4.5 penicillin-streptomycin solution (penicillin 10,000 u/ml. streptomycin 10,000 u/ml.) : Cat.#600-5140, Gibco Laboratories, Life technologies, inc. U.S.A.

4.6 Fungizone (Amphotericin B-250 ug/ml.) : Cat. #600-5295, Grand Island Biological Company, U.S.A.

4.7 Fetal Bovine Serum (FBS) : Cat. #200-6140, Gibco New Zealand LTD. U.S.A.

4.8 Horse Serum (HS) : Cat. #200-6050, Gibco Lab., U.S.A.

4.9 Bovine Serum Albumin (BSA) : Cat. #A-4378, Sigma Chemical Company, U.S.A.

4.10 Trypsin (2.5%) : Cat. #610-5095, Gibco Lab., U.S.A.

5. สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยง Mouse Leydic Cells

5.1 Medium 199 : Cat. No. E-11, Grand Island Biological Company, U.S.A.

5.2 Bovine Serum Albumin (BSA) : No. A-4378, Sigma Chemical Company, U.S.A.

5.3 HEPES : No. H-3375, Sigma Chemical Company, U.S.A.

5.4 sodiumbicarbonate ($NaHCO_3$) : E. Merck, Darmstadt, Germany

5.5 penicillin-streptomycin solution : Cat. #600-5140, Gibco. Lab., U.S.A.

6. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเทสโตสเตอโรน โดยวิธี RIA

6.1 charcoal eagent : Batch No. 82/83/R, WHO RIA Reagent Programme Switzerland

6.2 dextran Reagent : Batch No. 82/83/S, WHO RIA Reagent Programme Switzerland

6.3 diethyl ether : E. Merck, Darmstadt, Germany

6.4 sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4, MW.120) : E. Merck, Darmstadt, Germany

6.5 disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4, MW.142) : E. Merck, Darmstadt, Germany

6.6 sodium Chloride (NaCl, MW.58.44) : E. Merck, Darmstadt, Germany

6.7 thiomersal (merthiolate): No. T-5152, Sigma chemical company, U.S.A.

6.8 gelatin : Difco Laboratories, U.S.A.

6.9 toluene : E. Merck, Darmstadt, Germany

6.10 dioxane : E. Merck, Darmstadt, Germany

6.11 liquifluor : No. NEF-903, New England Nuclear, U.S.A.

7. สารเคมีสำหรับติดสลาก LH ด้วยไอโอดีน-125

7.1 chloramine-T (MW.281.69): E. Merck, Darmstadt, Germany

7.2 sodium metabisulphite ($Na_2S_2O_5$, MW.190.10) : No. 1-3552, J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.

7.3 potassium Iodide (KI) : No. 29631, BKH Chemical Ltd., England

7.4 sucrose (anhydrous) : Ar. Grade, May & Baker Ltd. England

7.5 sephadex G-25 Fine : No. 17-0032-01, Pharmacia Fine Chemical Uppsala, Sweden

7.6 sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$, MW. 137.99) : E. Merck, Darmstadt, Germany

7.7 disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$, MW.177.99) : E. Merck, Darmstadt, Germany

7.8 thiomersal (merthiolate) : No. T-5152, Sigma Chemical company, U.S.A.

7.9 gelatin : Difco Laboratories, U.S.A.

7.10 EDTA (MW.372.2) : No. 1-8993, J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.

8. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ LH โดยวิธี RIA

8.1 EDTA (MW. 372.2) : No. 1-8993, J.T. Baker Chemical Co. U.S.A.

8.2 sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$, MW. 137.99) : E. Merck, Darmstadt, Germany

8.3 disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$, MW. 177.99) : E. Merck, Darmstadt, Germany

8.4 thiomersal (merthiolate): No. T-5152, Sigma Chemical company, U.S.A.

8.5 gelatin : Difco Laboratories, U.S.A.

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด : Right A Weigh, WM. Ainsworth & Sons Inc., U.S.A.
2. เครื่องชั่งหยาบ : Mettler E200, Mettles Instrument, Switzerland
3. Magnetic Stirrer : S-18520, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
4. Mixer : M.16715, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
5. pH meter : 5985, Cole Parmer Instrument company, U.S.A.

012117

17580808

6. Refrigerated Centrifuge : Model PR-J, International Equipment company U.S.A.
7. Dynac Centrifuge : Clay adams, Becton Dickinson & company Parsippany, U.S.A.
8. Dri-Block Heater : Model DB-3, Tecam Laboratory and Industrial Equipment, U.S.A.
9. Gamma counter : LKB Multigamma Counter Model 1260 Multi gamma II, LKB wallac, Finnland.
10. β-Liquid Scintillation Counter : Model. BPL, Packard Instrument Co., U.S.A.
11. Micropipette : Pipetteman M81 Gilson France, Eppendorf 3130 Germany; Pipette Gun Clay Adams U.S.A.
12. Fraction Collector : Model 1850, Insturmentation Specialties Co. U.S.A.
13. Sterilizer : Model STM-E, Market Forge Co. U.S.A.
14. ตู้อบแห้ง : Drying cabinet series 2000, Termaks, U.S.A.
15. Hood : Serial No. NBB-193, Bellco Glass. Inc., U.S.A.
16. Incubator : UN-I-Trol CO_2 Incubator Model 329, Forma Scientific marietta, U.S.A.
17. Dubnoff incubator-Shaker: Model 3575-1, Lab-line instruments Inc. U.S.A.
18. Desicator with pump. : Model GL32, Glaswerk Werthein, U.S.A.

19. Phase contrast Microscope : AO. Series 10, American Optical Co. U.S.A.
20. Light Microscope : Model CKP, Olympus inverted Microscope, Tokyo, Japan
21. Hemacytometer : American Optical Scientific instrument, U.S.A.
22. เครื่องนับเซลล์ : Laboratory Counter, Clay Adams, Dickinson Co. U.S.A.
23. Millipore : Cat. No. SXOOO2500, Millipore Corp.-Bedford, U.S.A.
24. Millipore pore size 0.22 µ : Cat. No. GSWPO4700, Millipore Corp.-Bedford, U.S.A.
25. Millipore pore size 0.45 µ : Cat. No. GSWPO2500, Millipore Corp.-Bedford, U.S.A.
26. Bellco Dissociating Flask: Bellco Glass, Inc. U.S.A.
27. Polyethylene tube size 50 ml. : Cat. No. 3119-0050, Nalgene L Labware Department.Nalgene Company Rochester, U.S.A.
28. Tissue Culture dish 60 x 15 mm/vents : Cat. No. 1-50288, Nunclon Delta SI, Denmark
29. Multidish 24 wells : Cat. No. 1-46485, Nunclon Delta SI, Denmark
30. Dialysis tubing (M.W. cutoff 12,000) : Cat. No. 3781-D12, Arthur H. Thomas Co., U.S.A.

สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม

อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับแยกเซลล์ต่อมใต้สมอง (MEM)

ละลาย	MEM	1.140 กรัม
	โซเดียมไบคาร์บอเนต	0.035 กรัม

ในน้ำกลั่น (ที่กลั่นซ้ำ 3 หน) ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 เติมน้ำกลั่นจนปริมาณครบ 100 มล. กรองผ่าน Millipore ขนาด 0.22 μ เก็บไว้ที่ 4 °ซ ทุกครั้งที่ใช้จะต้องละลาย 0.1 % BSA และ 0.1 % trypsin

อาหารเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมอง

ละลาย	DMEM	20.00 กรัม
	HEPES	11.95 กรัม
	โซเดียมไบคาร์บอเนต	7.40 กรัม
	สารละลายเพนนิซิลิน-สเตรพโตมัยซิน	5.00 มล.
	Fungizone	0.40 มล.

ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,750 มล. กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่าน Millipore ขนาด 0.22 μ เติม HS 200 มล FBS 50 มล. ปริมาตรสุทธิของ DMEM เป็น 2 ลิตร แบ่งใส่ขวดเล็กที่ปลอดเชื้อขนาด 100 มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ

อาหารเลี้ยง Leydic Cell (M199)

ละลาย	M199	0.992 กรัม
	HEPES	0.596 กรัม
	โซเดียมไบคาร์บอเนต	0.035 กรัม
	สารละลายเพนนิซิลิน-สเตรพโตมัยซิน	1 มล.

ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่าน Millipore ขนาด 0.22 μ เก็บไว้ที่ 4 °ซ. ทุกครั้งที่ใช้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาเติม 0.2 % BSA

สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA

Assay buffer

ละลาย Gelatin 1.00 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มล. อุ่นให้ Gelatin ละลายจนหมด ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงละลาย odium dihydrogen phosphate (anhydrous) 2.35 กรัม
disodium hydrogen phosphate (anhydrous) 11.60 กรัม
sodium chloride 8.80 กรัม
thiomersal 0.10 กรัม

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

Charcoal Suspension

ละลาย dextran 0.0625 กรัม ใน assay buffer 100 มล. แล้วจึงเติม charcoal 0.625 กรัม เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาที เก็บไว้ที่ 4 °ซ. ได้นาน 1 เดือน เมื่อจะใช้ต้องนำไปกวนที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ตลอดเวลาที่ใช้

Counting Solution

ตวง	toluene	3,000	มล.
	liquifluor	128	มล.
	dioxane	600	มล.

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

สารละลายสำหรับติดสลาก rLH และวิเคราะห์หา rLH โดยวิธี RIA

สารละลายตั้งต้น A. (stock solution A)

โมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต 0.5 M. เตรียมโดยละลาย $NaH_2PO_4.H_2O$ (MW. 137.99) 69.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

สารละลายตั้งต้น B. (stock solution B)

ไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต 0.5 M. เตรียมโดยละลาย $Na_2HPO_4.2H_2O$ (MW. 177.99) 89.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 M., pH 7.5 (สำหรับทำ Iodination)

ผสม stock solution A 100 มล. กับ stock solution B 200 มล. แบ่งเก็บไว้ในขวดเล็กตามปริมาตรที่จะนำออกมาใช้ เก็บไว้ที่ -20 °ซ.

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 0.05 M., pH 7.0 (PBS)

ละลาย NaCl 143.0 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล.

เติม stock solution A 151 มล.

stock solution B 239 มล.

Thimerosal 1.75 มล.

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 17.5 ลิตร

EDTA-PBS 0.05 M., pH 7.0

ละลาย EDTA 18.0 กรัม ใน PBS 800 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.0 เติมปริมาตรจนครบ 1 ลิตรด้วย PBS เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ได้นาน 6 เดือน

Gel-PBS 0.05 M. pH 7.0

ละลาย gelatin 1 กรัม ใน PBS 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ. ได้นาน 6 เดือน ทุกครั้งที่จะนำออกมาใช้ ต้องปรับ pH ให้ได้ 7.0 ก่อนทุกครั้ง

สารละลายคลอรามีน-ที (2 มก./มล.)

ละลายคลอรามีน-ที (MW. 281.69) 100 มก. ใน PBS 50 มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ (1 มก./มล.)

ละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ ($Na_2S_2O_5$, MW. 190.10) 100 มก. ใน PBS 100 มล. สารละลายนี้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

Transfer solution (สำหรับ Iodination)

ละลาย sucrose 16.0 กรัม และโปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI) 1.0 กรัม ใน PBS

100 มล. เก็บไว้ที่ -20 °ซ.

8 % sucrose solution

ละลายซูโครส 8.0 กรัม และโปตัสเซียมไอโอไดด์ 1.0 กรัม ใน PBS 100 มล. เก็บไว้ที่ -20 °ซ.

ฮอร์โมนสำหรับติดสลาก

rLH-I-6 (AFP-6833C) เป็นฮอร์โมนที่ใช้สำหรับติดสลากด้วยไอโอดีน-125 ได้จาก NIADDK อยู่ในสภาพที่ทำให้แห้ง (lyophilized) มี 100 µg/vial นำมาละลายใน phosphate buffer 0.5 M. pH 7.5 1.0 มล. แบ่งเก็บใส่ขวดเล็ก ขวดละ 50 µl ซึ่งจะมี rLH-I-6 อยู่ 5 µg เก็บไว้ที่ -40 °ซ ได้นาน 3 เดือน

ฮอร์โมนมาตรฐาน

rLH-RP-2(AFP-5666C) จาก NIADDK เป็นฮอร์โมนมาตรฐาน ซึ่งอยู่ในสภาะที่ถูกทำให้แห้งบรรจุ 5 µg/vial นำมาละลายด้วย PBS 1 ml. แบ่งเก็บไว้ในขวดเล็กขวดละ 125 µg/25 µl เป็น rLH มาตรฐานตั้งต้น (Stock standard rLH) เก็บไว้ที่ -40° ซ. ได้นาน 5 เดือน

วิธีการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูขาว

การตรวจวงอีสตรัส ใช้หนูขาวเพศเมียอายุ 2-4 เดือน ซึ่งมีวงอีสตรัสเป็นปกติติดต่อกันอย่างน้อย 3 วง โดยทำ vaginal smear ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Long & Evan 1922 โดยใช้แท่งแก้วปลายมนทำความสะอาดด้วย 70 % อัลกอฮอล์ แล้วจุ่มใน 0.85 % NaCl สอดเข้าภายในช่องคลอด ใช้ปลายแท่งแก้วแตะเข้ากับผนังช่องคลอดเบา ๆ แล้วเอาออกมาแตะบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นเซลล์ชนิดใด และบันทึกผล

การผสมพันธุ์ ตรวจการตั้งครรภ์และการเลี้ยงลูกอ่อน

เมื่อทำการตรวจวงอีสตรัสของหนูแม่พันธุ์ โดยการทำ vaginal smear ดูเซลล์จากช่องคลอด เลือกเฉพาะหนูที่มีเซลล์จากช่องคลอดเป็น nucleated epithelial cell ซึ่งแสดงว่าหนูนั้นอยู่ในระยะ proestrus ในช่วงสุดท้ายของระยะนี้ แม่พันธุ์จะเป็นสัดเป็นระยะที่ใกล้กับเวลาตกไข่ นำหนูเหล่านี้ไปใส่ในกรงหนูพ่อพันธุ์ โดยใช้พ่อพันธุ์ : แม่พันธุ์ เป็น 1 : 1 หรือ 2 : 1 ทิ้งไว้ 1 คืน วันรุ่งขึ้นตรวจหาสเปิร์มโดยการทำ vaginal smear เช่นกัน ถ้าพบจะนับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ (P_1) วันต่อไปก็จะเป็น P_2, P_3, ... ถ้า smear ต่อไปอีกจะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวติดต่อกันไปตลอดการตั้งครรภ์ ในส่วนน้อยอาจพบเซลล์ชนิดอื่นบ้าง แต่ถ้าพบ cornified epithelial cells จำนวนมากภายหลังพร้อมกับพบผลึกซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งปะปนอยู่ เป็นลักษณะที่พบเมื่อเกิดการแท้ง

การเตรียมคลอด หนูขาวใช้เวลาท้องนานประมาณ 21-23 วัน เมื่อถึงวันที่ 17-18 แยกหนูที่ท้องออกเป็นกรงละ 1 ตัว หลังจากคลอดแล้ว 10 วัน เลือกลูกหนูตัวผู้ให้อยู่กับแม่พันธุ์คลอกละ 7±1 ตัว เพื่อให้ลูกหนูตัวผู้ที่จะใช้ทำการทดลองมีสุขภาพสมบูรณ์ ให้ลูกหนูนี้ดูดนมจน 23-25 วัน จึงนำมาใช้เพื่อให้เซลล์ต่อมใต้สมองสำหรับเพาะเลี้ยงเพื่อการทดลองต่อไป

การคัดเลือกลิงหางยาว

ใช้ลิงหางยาวที่เลี้ยงในเรือนเลี้ยงลิงของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลิงหางยาวที่ใช้เป็นลิงที่มีสุขภาพสมบูรณ์ และไม่ผ่านการทดลองหรือให้ยาใด ๆ ทั้งสิ้น ลิงเพศเมียต้องมีรอบประจำเดือนที่สม่ำเสมอมาแล้วอย่างน้อย 3 รอบประจำเดือน ก่อนนำมาทำการทดลอง ลิงที่ใช้มีจำนวน 11 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 3 ช่วงอายุดังนี้

ระยะโตเต็มวัย (adult; A) เพศผู้อายุประมาณ 8 ปี 9 เดือน จำนวน 1 ตัว เพศเมียอายุ13 ปี 3 เดือน -13 ปี 5 เดือน จำนวน1 ตัว

ระยะย่างเข้าวัยเจริญพันธุ์ (puberty; P) เพศผู้อายุ 3 ปี 2 เดือน - 3 ปี 4 เดือน จำนวน 2 ตัว เพศเมียอายุ 3 ปี 3 เดือน -3 ปี 5 เดือน จำนวน 3 ตัว

ระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์ (immature; I) เพศผู้อายุ 1 ปี 6 เดือน - 1 ปี 8 เดือน จำนวน 1 ตัว เพศเมียอายุ 1 ปี 3 เดือน - 1 ปี 5 เดือน จำนวน 3 ตัว

การเก็บชีรัม

เจาะเลือดลิงตามช่วงอายุดังกล่าว โดยเจาะจาก femoral vein ครั้งละ 3 ml. ระหว่างเวลา 09.00 น.-10.00 น. สัปดาห์ละ 2 ครั้ง (วันจันทร์และวันศุกร์) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เลือดที่เจาะในแต่ละครั้งเก็บไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. จากนั้นนำไปปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 30 นาที แยกชีรัมไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ. เมื่อครบ 8 สัปดาห์ นำชีรัมของลิงหางยาวเพศและอายุเดียวกันมารวมกันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ. จนกว่าจะทำการศึกษาผลของชีรัมดังกล่าวต่อการหลั่งฮอร์โมนจากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาว ชีรัมนี้ก่อนที่จะทำการศึกษาผลต้องผ่านการกรองด้วย millipore ขนาด 0.45 μ ก่อน

การแยกเซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาว

การแยกเซลล์และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า ตามวิธี Asawaroengchai, 1983 ดังนี้คือ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูขาวเพศผู้อายุ 23-25 วัน ใช้กรรไกรตัดคอหนูขาว เปิดกระโหลกและพลิกสมองขึ้นทั้งหมด จะพบเยื่อ Sella diaphragm คลุมต่อมใต้สมองอยู่ และต่อมใต้สมองจะอยู่ในแอ่ง Sella turcica ของ Sphenoid bone ใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อ

(โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านไปบนเปลวไฟ) เขี่ยแยก Sella diaphragm ออก จะเห็นต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่กลางต่อม ใช้ปากคีบแยกเอาส่วนนี้ออกเสีย ข้อนต่อมใต้สมองส่วนหน้านี้ออกมาล้าง 2 ครั้งใน Mininal Essential Medium (MEM) ซึ่งมี BSA 0.1% $NaHCO_3$ 0.035% Penicillin 50 U/ml.และ Streptomycin 50 µg/ml. ที่ pH 7.2 ใช้ใบมีดโกนที่ปลอดเชื้อสับและตัดต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้ละเอียด นำกลุ่มเซลล์เหล่านี้ใส่ใน Bellco dissociating flask (ที่มี MEM 10 ml. และ Trypsin 0.1%) โดยมี magnetic propeller ปั่นเบา ๆ เพื่อให้สารละลายหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลาใน water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37° ซ. โดยที่ทุก ๆ 20 นาที ใช้ pasture pipette ที่ปลอดเชื้อดูดสารละลายดังกล่าวขึ้นลง 20 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แยกกันดีขึ้น หลังจากอินคิวเบทจนสังเกตเห็นว่าไม่มีเนื้อเยื่อเป็นชิ้นใหญ่อยู่อีกต่อไป ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงแล้ว กรองเซลล์โดยดูดสารละลายผ่าน nylon mesh (Nitex 102) เพื่อแยกเอาส่วน debris ออกไป สารละลายที่กรองได้นำไปปั่นที่ 100xG (1,500 รอบต่อนาที) นาน 15 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออกจากเอนไซม์ cell pellet ที่ได้นำไปทำให้กระจายอีกครั้งใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10 ml. ที่มี horse serum 10% fetal bovine serum 2.5% penicillin 50 U/ml. streptomycin 50 µg/ml. และ Fungizone 50 µg/lit. เซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่ได้ นำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้ phase contrast microscope โดยใช้ Hemaccytometer และตรวจหา viability ของเซลล์ด้วยการหยด 0.1 % Trypan blue 1 หยด cell suspension 1 หยด เขย่า ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปตรวจนับเซลล์ที่ติดสีและไม่ติดสี เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน และจากการหา Viability นี้ได้ประมาณ 90% จากนั้นแบ่งจำนวนเซลล์ใส่ในถาดพลาสติกหลุมเลี้ยงเซลล์ (Multidish 24 wells) จำนวน 10^5 เซลล์/2 ml. DMEM/หลุม นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37° ซ. อิ่มตัวด้วยไอน้ำและในบรรยากาศของ CO_2 5% ผสมกับอากาศนาน 48 ชั่วโมง

การทดลอง

ภายหลังจากการที่แยกเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาวและเลี้ยงใน DMEM นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งถือเป็นระยะ preincubation เป็นระยะที่ยังไม่เริ่มการทดลองโดยการเติมสารใด ๆ ภายใน 48 ชั่วโมงนี้ เป็นระยะเวลาที่เซลล์ที่แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ได้ซ่อมแซมตัวเองภายหลังจากที่ต้อง expose กับเอนไซม์ เป็นระยะเวลาที่เซลล์หลั่งสารต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นตอนอยู่ในตัวสัตว์ทดลอง และปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ เมื่อ preincubation ครบ

48 ชั่วโมงแล้ว นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้นี้มาตรวจสอบลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเซลล์ส่วนมากเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ไฟโปรบลาส(fibroblast) และเกาะกับพื้นถาดพลาสติกหลุม มีจำนวนน้อยที่ยังคงเป็นรูปทรงเดิม และไม่เกาะกับถาดพลาสติกหลุม ฉะนั้นในการเก็บและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกครั้งต้องนำเอาเซลล์ที่ยังไม่เกาะติดกับถาดพลาสติกหลุมนี้กลับคืนไปด้วยการนำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ไปปั่นแยกเอาเซลล์ออกที่ 100 × G (1,500 รอบต่อนาที) นาน 15 นาที แล้วจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ที่ -20 °ซ. cell pellet นำเข้าหลุมเดิมทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

<u>การทดลองที่ 1</u> <u>ผลของซีรัมลิงหางยาวระยะต่าง ๆ</u>

หลังจาก preincubation ครบ 48 ชั่วโมงแล้ว แบ่งกลุ่มหลุมที่เลี้ยงเซลล์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง กลุ่มละ 3 หลุม

1.1 กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์

1.2 กลุ่มทดลอง เป็นกลุ่มที่มีซีรัมลิงหางยาวอยู่ 6% โดยมี DMEM 1.88 ml. และซีรัมลิงหางยาว 0.12 ml.

เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์และซีรัมจนครบแล้ว นำไป incubate ไว้ตามเดิม เก็บและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และทำการทดลองทุก 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ครั้ง อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้ เก็บไว้ที่ -20 °ซ. จนกว่าจะทำการตรวจหาปริมาณ rLH โดยวิธี BA และ RIA

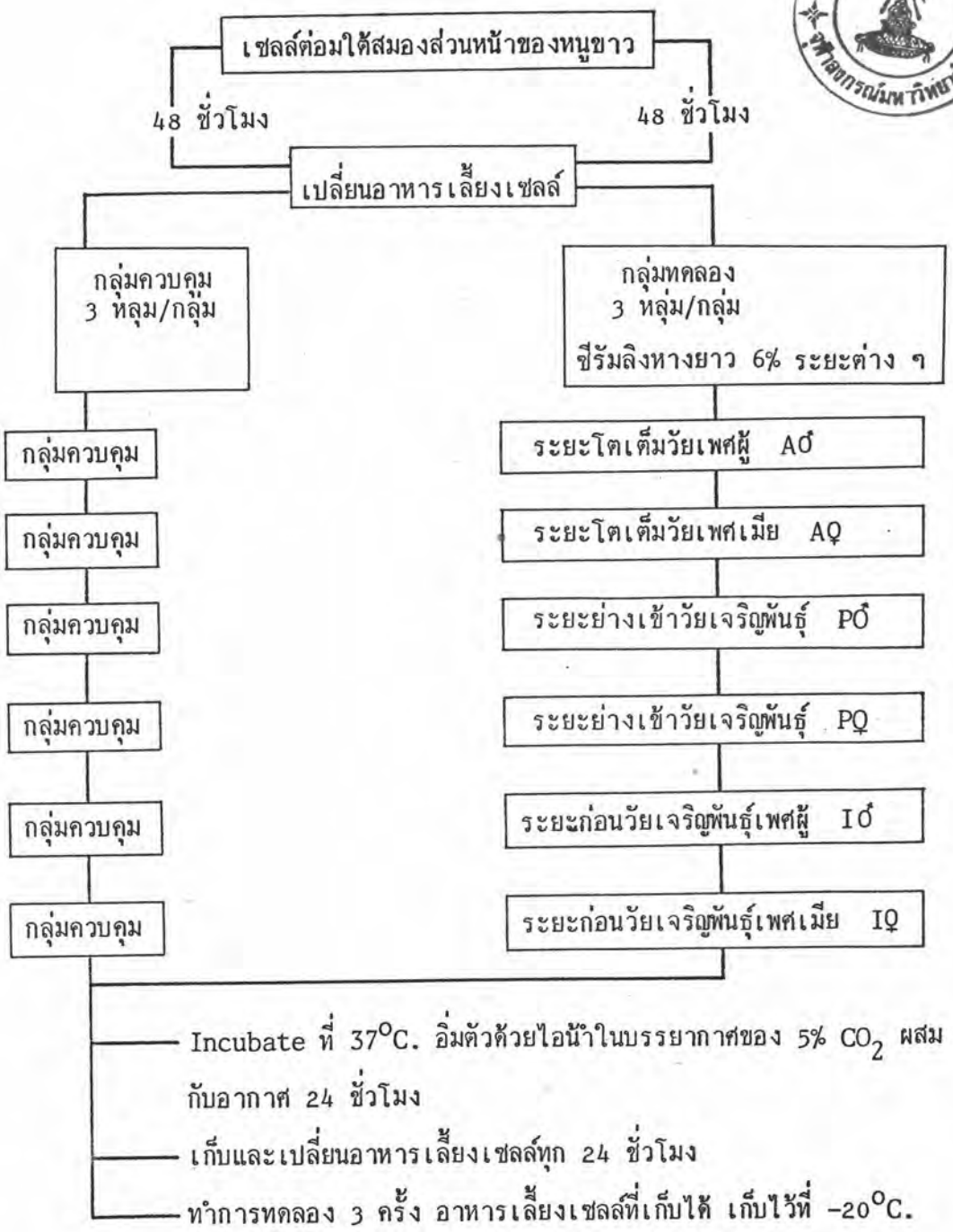
<u>การทดลองที่ 2</u> <u>ผลของ GnRH สังเคราะห์ 7.5×10^{-12} M.</u>

2.1 กลุ่มควบคุม ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

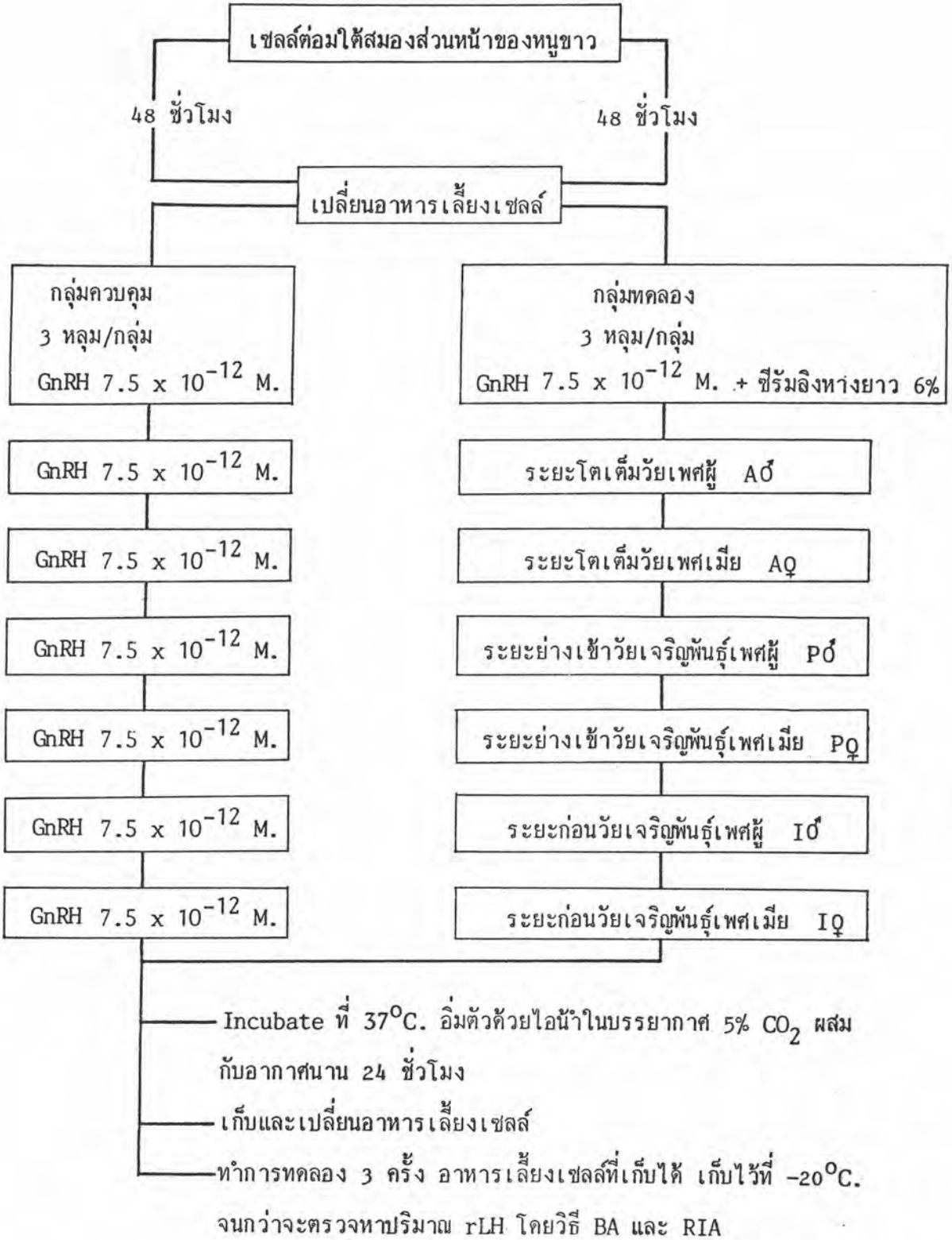
2.2 กลุ่มทดลอง เติม DMEM 1.990 ml. และ GnRH สังเคราะห์ที่มีความเข้มข้น 4×10^{-8} M. จำนวน 10 µl ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของ GnRH สังเคราะห์เป็น 7.5×10^{-12} M/หลุม

เมื่อทำการทดลองเสร็จแล้วนำไป incubate ไว้ตามเดิม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และทำการทดลองทุก 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ครั้ง อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้ เก็บไว้ที่ -20° ซ. เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

หอสมุดกลาง 26 ปีนวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แผนผัง แสดงการทดลองที่ 1 ผลของชีรัมลิงหางยาวต่อการหลั่ง rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาวเพศผู้อายุ 23-25 วัน



รูปที่ 2 แผนผังแสดงการทดลองที่ 3 ผลของ GnRH สังเคราะห์ 7.5 x 10^{-12} M. ร่วมกับซีรัมลิงหางยาวต่อการหลั่ง rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาวเพศผู้อายุ 23-25 วัน

การทดลองที่ 3 ผลของ GnRH สังเคราะห์ $7.5x10^{-12}$ M. ร่วมกับซีรัมลิงหางยาวระยะต่าง ๆ

3.1 กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่เติม GnRH สังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $7.5x10^{-12}$ M. ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

3.2 กลุ่มทดลอง ทำเช่นเดียวกับกลุ่มทดลองในการทดลองที่ 2 แต่เติมซีรัมลิงหางยาวลงไป 6% โดยใส่ DMEM1.870 ml. GnRH สังเคราะห์ความเข้มข้น 4×10^{-8} M. จำนวน 10 µl ซีรัมลิงหางยาว 0.12 ml.

เมื่อเติมครบแล้วนำไป incubate ไว้ตามเดิม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และทำการทดลองทำนองเดียวกันกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 4 การแยกซีรัมลิงหางยาวและผลของส่วน High และ Low Molecular weight

4.1 การแยกส่วนของซีรัมลิงหางยาว

1. ดูดซีรัมลิงหางยาวระยะย่างเข้าวัยเจริญพันธุ์เพศเมียจำนวน 6 ml. ใส่ใน Dialyzer tubing (MW. cut off 12,000) ผูกหัวท้ายของ tube ให้แน่น

2. นำไปแช่ในน้ำกลั่นที่กลั่นซ้ำ 3 ครั้ง 87.0 ml. ที่มี HEPES 0.597 gm. และ $NaHCO_3$ 0.37 gm. ละลายอยู่ เก็บไว้ที่ 4 °ซ. นาน 24 ชั่วโมง ส่วนของซีรัมที่มีโมเลกุลน้อยกว่า 12,000 ดาลตัน จะซึมออกมาละลายอยู่ในสารละลายที่ใช้แช่นี้

3. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เก็บเอาส่วนของซีรัมที่อยู่ใน Dialyzer tubing ไว้ที่ -20 °ซ. จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป ส่วนสารละลายที่มีส่วน Dialysate อยู่นั้น นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml โดยเติม DMEM 1 gm. Penn-strep solution 0.5 ml. Horse serum 10 ml. และ Fetal bovine serum 2.5 ml. ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วน Dialysate (low molecular weight) ผสมอยู่ 6 %

4.2 ผลของส่วน High และ Low molecular weight

4.2.1 กลุ่มควบคุม เติมเฉพาะ DMEM 2 ml.

4.2.2 กลุ่มทดลอง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

4.2.2.1 กลุ่มที่ทดสอบกับส่วน High molecular weight ใช้ non-dialysable fraction เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ 6% โดยมีส่วน non-dialysable fraction 0.12 ml. DMEM 1.88 ml.

4.2.2.2 กลุ่มที่ทดสอบกับส่วน Low molecular weight ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วน dialysate ผสมอยู่ 6% เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ml.

เมื่อทำการทดลองเสร็จแล้ว นำไป incubate ไว้ตามเดิม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และทำซ้ำทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 3 ครั้งเหมือนการทดลองที่ 1

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง อาหารเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ที่ -20° ซ. นำมาตรวจวัดหาปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอเอสเสย์และ RIA ดังต่อไปนี้

<u>การตรวจวัดหาปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอเอสเสย์</u> (BA)

การตรวจวัดหาปริมาณ rLH โดยวิธี BA นี้ใช้วิธี Mouse leydic cells bioassay for LH (Dufau et al., 1976) ซึ่งเป็นที่นิยมและเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย วิธีการนี้อาศัยคุณสมบัติของ LH ที่มีผลกระตุ้นเซลล์เป้าหมายคือ leydic cells ของอัณฑะ (<u>in vitro</u>) ให้สร้างฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนมากน้อยตามปริมาณของ LH ที่ปรากฏ การวัดค่าฮอร์โมนเทสโทส-เตอโรนนี้ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ปริมาณ LH ในสารตัวอย่างที่ต้องการทราบได้

<u>การเตรียม Leydic cell</u>

หนูไมซ์พันธุ์สวิสเพศผู้อายุ 28 วัน 2 ตัว นำเอา Leydic cell ออกมาจากอัณฑะด้วยการเปิดหน้าท้องหนูด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบดึงเอาอัณฑะออกมาจากถุงอัณฑะไปล้างใน M199 ที่มี 0.2% BSA 1 มล. ใน culture dish (60x15 m.m.) ที่วางอยู่บนกระบะน้ำแข็ง เจาะเยื่อบาง ๆ ที่หุ้มถุงอัณฑะด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ และใช้เข็มเขี่ยกลุ่มเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในถุงอัณฑะออกจนหมดลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ตัดกลุ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้จนละเอียดแล้วนำไปใส่ในบีคเกอร์ที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 24 มล. นำไปกวนที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เพื่อให้ seminiferous tubules กระจายออกทั่วกัน ทุก 5 นาที ใช้ pasture pipette ดูดกลุ่มเนื้อเยื่อขึ้นลง 20 ครั้ง ซึ่งช่วยให้เซลล์แยกตัวกันดีขึ้น

กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดผ่าน nylon mesh (Nitex 102) ลงใน Erlen-meyer flask ขนาด 50 มล. แล้วจึงนำไป incubate ใน Dubnoff Metabolic Shaker

Incubator ที่อุณหภูมิ 34 °ซ. เขย่า 60 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เมื่อ incubate ครบ 1 ชั่วโมงแล้ว นำไปปั่นที่ 100 × G (1,500 รอบต่อนาที) ที่ 4 °ซ. นาน 15 นาที อาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป นำกลุ่มเซลล์ไปทำให้กระจายอีกครั้งด้วย M199 ที่มี 0.2 % BSA 30 มล. นำเซลล์ที่เตรียมได้ได้นี้ไปนับหาจำนวนเซลล์ภายใต้ phase contrast microscope โดยใช้ Hemacytometer และตรวจหาเปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดด้วยการหยด 0.1 % trypan blue 1 หยด cell suspension 1 หยด เขย่าตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปตรวจนับเซลล์ที่ติดสีและไม่ติดสี ภายใต้ phase contrast microscope เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน เซลล์ที่เตรียมได้นี้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 5×10^4 เซลล์/100 µl และมีอัตราการมีชีวิตรอดมากกว่า 90 % นำเซลล์ที่เตรียมได้นี้ไปกวนตลอดเวลาที่ 4 °ซ. ในขณะที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาปริมาณ

1.1 <u>การเตรียม rLH มาตรฐาน</u>

rLH-RP-2 (AFP566C) ที่ความเข้มข้นขวดละ 125 ng/25 µl นำมาเจือจางด้วย M199 ที่มี 0.2 % BSA ให้มีความเข้มข้นแรกเป็น 25 ng/100 µl จากนั้นทำ serial dilution ลงไปอีก 5 ลำดับ จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.78 ng/100 µl แบ่งฮอร์โมนมาตรฐานที่เตรียมได้นี้ แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 100 µl ซ้ำกัน 3 หลอด

<u>ขั้นตอนการทำไบโอเอสเสย์ของ rLH</u>

การทำไบโอเอสเสย์ของ rLH มีขั้นตอนการทำดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 แสดงการทำไบโอเอสเสย์ของ rLH

หลอดทดลอง	M199 + 0.2%BSA	cell suspension	Incubation
Blank	200 µl	-	34°C 2 ชั่วโมง
0 ชั่วโมง	100 µl	100 µl	4°C 2 ชั่วโมง
2 ชั่วโมง	100 µl	100 µl	34°C 2 ชั่วโมง
สารละลายมาตรฐาน หรือสารตัวอย่าง	-	100 µl	34°C 2 ชั่วโมง

หมายเหตุ สารละลายตัวอย่างที่จะนำมาตราจวัดปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอเอสเสย์ ใช้ 100 µl หรือหากใช้ปริมาตรต่ำกว่านี้ใช้ M199 + 0.2 % BSA ปรับปริมาตรให้ครบ 100 µl

Quality control ใช้ซีรัมหนูขาวเพศเมีย 50 µl 25 µl และ 10 µl ปรับปริมาตรให้ครบ 100 µl ด้วย M199 + 0.2 % BSA

Plain medium เพื่อตรวจวัดหาความสามารถของอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมอง (DMEM) ที่ไม่มี rLH อยู่สามารถกระตุ้น Leydic cell ให้สร้างเทสโทสเตอโรนได้มากน้อยเพียงใด จึงใช้ DMEM จำนวน 100 µl เป็นสารละลายตัวอย่างด้วย

หลังจาก incubate ครบ 2 ชั่วโมงแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำหลอดทดลองทุกหลอดลงแช่ในกระบะน้ำแข็งทันที นำอาหารเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ไปตรวจวัดหาปริมาณเทสโทสเตอ-โรนโดยใช้ RIA ต่อไป

การเตรียม Testosterone working tracer

จาก (1,2,6,7-^{3}H) testosterone ซึ่งละลายใน benzene: ethanol ในอัตราส่วน 9 : 1 เป็น testosterone stock tracer ที่มีความแรง 5 µCi/มล. นำมาเจือจางให้ได้ 100 nCi /มล. ด้วยการนำ testosterone stock tracer จำนวน 1 มล. เป่าให้แห้งด้วย compresser air แล้วจึงเติม assay buffer 50 มล. ผสมให้เข้ากันจะได้ testosterone working tracer ที่มีความแรง 100 nCi/มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ. เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

การเตรียม Testosterone antisera

Testosterone antiserum จาก WHO ซึ่งอยู่ในสภาพถูกทำให้แห้ง (lyophilized) นำมาเติม assay buffer 10 มล. เขย่าให้ละลายจนหมด เตรียมแล้วใช้ได้ทันที เก็บไว้ที่ 4 °ซ. เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ ภายหลังจากที่เติมลงในหลอดทดลองแล้ว (100 µl) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 : 210,000

การเตรียม Testosterone standard

Testosterone standard จาก WHO ซึ่งบรรจุอยู่ใน Ampoule นี้มีปริมาตร 500 µl ความเข้มข้น 220 nM/L นำมาเจือจางลง 10 เท่า ด้วยการเติม assay buffer

4.5 มล. เป็น Stock testosterone standard ที่มีความเข้มข้น 22 nM/L เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

จาก Stock testosterone standard นำมา 500 µl เจือจางลงอีก 10 เท่า ด้วยการเติม assay buffer 4.5 มล. จะได้ testosterone standard ความเข้มข้นแรกที่ 1,100 fm/500 µl จากนั้นทำ Serial dilution ลงไปอีก 7 ลำดับ ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 8.59 fm/500 µl แบ่งฮอร์โมนมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 500 µl ซ้ำกัน 3 หลอด

การตรวจหาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA

การตรวจหาปริมาณเทสโทสเตอโรนด้วยวิธี RIA ดัดแปลงจากวิธีของ WHO,1981 ดังนี้

การสกัด

หลังจาก incubate อาหารเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองกับ eydic cell ของหนู Mice ที่ 34 °ซ. ครบ 2 ชั่วโมงแล้ว ปริมาณเทสโทสเตอโรนในแต่ละหลอดทดลองนำมาสกัดด้วย ไดเอธิล อีเทอร์ เติมไดเอธิล อีเทอร์ ลงในทุกหลอด หลอดละ 5 มล. อุดปากหลอดด้วยจุกพลาสติก ทำการสกัดด้วยการพลิก rack ที่ใส่หลอด ควำ-หงาย ประมาณ 50 ครั้งต่อนาที นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จึงนำไปปั่นที่ 500 × G (2,500 รอบต่อนาที) ที่ 4 °ซ. นาน 15 นาที เพื่อให้ Leydic cells ตกตะกอนเทสโทสเตอโรนจะถูกสกัดไปอยู่ในชั้นของ diethyl ether แยกชั้นของ diethyl ether ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยการนำไปแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่แช่อยู่ใน ethanol 95% รินส่วนใสที่เป็น ไดเอธิล อีเทอร์ ลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่งที่เตรียมไว้ นำไปทำให้แห้งด้วย Dri block heater ที่อุณหภูมิ 40-80 °ซ. หลอดทดลองที่แห้งสนิทแล้วเติม ไดเอธิล อีเทอร์ อีก 1 มล. เพื่อไปชะล้างฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดให้ลงไปรวมกันที่ก้นหลอด และนำไปทำให้แห้งอีกครั้งเมื่อทุกหลอดแห้งสนิทแล้ว นำไปเติม assay buffer 500 µl เพื่อไปชะล้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดให้มาอยู่ในบัฟเฟอร์ เตรียมฮอร์โมนมาตรฐานแอนติบอดีและ working tracer เติม testosterone working tracer และ antiserum (Ab) อย่างละ 100 µl โดยมีขั้นตอนการทำดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2 แสดงการตรวจวัดเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA

หลอดทดลอง	Assay buffer	Tracer	Antibody		Charcoal suspension
Tc	600 µl	100 µl	-	ตั้งไว้ที่ 4 °ซ. ค้างคืน	-
NSB	600 µl	100 µl	-		200 µl
TBo	500 µl	100 µl	100 µl		200 µl
สารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายตัวอย่าง	500 µl	100 µl	100 µl		200 µl

Quality control ใช้ซีรัมหนูขาวเพศเมีย 100 µl 50 µl และ 25 µl สกัดด้วย diethyl ether 1 นาที แล้วจึงเติม assay buffer tracer และ antibody

TCR (total count recovery) โดยใช้ working tracer เจือจางลง 10 เท่า จำนวน 100 µl และ buffer 600 µl ใส่ใน counting vial

REC (recovery) ใช้ working tracer ที่เจือจางลง 10 เท่า จำนวน 100 µl ผสมกับซีรัมหนูขาวเพศเมีย 25 µl ตั้งไว้ 30 นาที แล้วจึงนำไปสกัดด้วยไดเอธิล - อีเทอร์ 1 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำและซีรัมออกไป ระเหยไดเอธิล อีเทอร์ ออกไปจนหมด เติม assay buffer 700 µl เขย่าแล้วจึงเทใส่ใน counting vial

หลังจากเติม tracer และ antibody แล้ว ตั้งไว้ที่ 4 °ซ. ค้างคืนแล้วจึงเติม charcoal suspension 200 µl เขย่าตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 15 นาที นำไปปั่นแยกเอา charcoal ออกที่ 500 x G (2,500 รอบต่อนาทีที่ 4 °ซ. นาน 15 นาที เทส่วนใสที่เป็นส่วน bound form ใส่ใน counting vial และเติม counting solution 4.5 มล. เขย่าและนำไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β-Liquid Scintillation Counter 5 นาทีต่อ vial

การคำนวณและอ่านค่าฮอร์โมน

นำค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ (count per minute, cpm) ของแต่ละ vial ซึ่งทำซ้ำกัน ตัวอย่างละ 3 vial มาหาค่าเฉลี่ยหรือมัชฌิมเลขคณิต ลบออกด้วยค่า cpm ของส่วนที่เป็น NSB ทุกตัวอย่าง ยกเว้นส่วนที่เป็น TC

TBo หรือ maximum binding คำนวณได้จาก

$$\frac{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TBo} - \text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB})}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TC}} \times 100\ \%$$

ในการตรวจวัดเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA นี้ มี maximum binding ประมาณ 50%

เปอร์เซนต์ Recovery คำนวณได้จาก $\frac{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ REC}}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR}} \times 100\ \%$

ในการตรวจวัดนี้มีค่าประมาณ 90 %

การทำกราฟเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน นำค่าเฉลี่ย cpm ในส่วนของเทสโทสเตอโรนมาตรฐานลบออกด้วยค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB แล้วจึงนำเอาค่า cpm ที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง log ความเข้มข้นของเทสโทสเตอโรนมาตรฐานกับ cpm ของ bound เทสโทสเตอโรนบน semi-logarithmic graph ปริมาณของเทสโทสเตอโรนในสารตัวอย่างจะหาได้จากเส้นกราฟมาตรฐานที่ได้นี้

การทำกราฟ rLH มาตรฐาน นำค่าปริมาณเทสโทสเตอโรนที่อ่านได้ในส่วนที่เป็น rLH มาตรฐาน มาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของเทสโทสเตอโรนเป็น fm/หลอด กับความเข้มข้นของ rLH มาตรฐานบน semilogarithmic graph ดังนั้นปริมาณของ rLH ในสารตัวอย่างจึงอ่านได้จากกราฟนี้ โดยเทียบจากปริมาณของเทสโทสเตอโรน

ถ้าหากปริมาณของเทสโทสเตอโรนในส่วนที่เป็น 2 ชั่วโมง มีปริมาณสูง มากกว่า 10 fm/หลอด แสดงให้เห็นถึงอายุของ Leydic cells ที่ใช้เป็นโมเดลในการตรวจหา LH ในครั้งนั้นมีอายุมากเกินไป การตรวจวัดนั้นจึงควรที่จะทำการตรวจวัดใหม่ โดยเลือกใช้ Leydic cells จากหนูที่มีอายุอ่อนกว่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การติดสลาก rLH ด้วยไอโอดีน-125

เตรียมเซฟาเดกซ์คอลัมน์

แช่เซฟาเดกซ์จี-25 ไฟน์ 5 กรัม ใน PBS 0.05 M. 100 มล. ที่อุณหภูมิห้องค้างคืน แล้วล้างด้วย EDTA-PBS 0.05 M. 3 ครั้ง ให้เซฟาเดกซ์แช่อยู่ใน EDTA-PBS นี้ 100 มล. นำไปดูดอากาศออกจนไม่มีฟองอากาศอยู่ในเซฟาเดกซ์

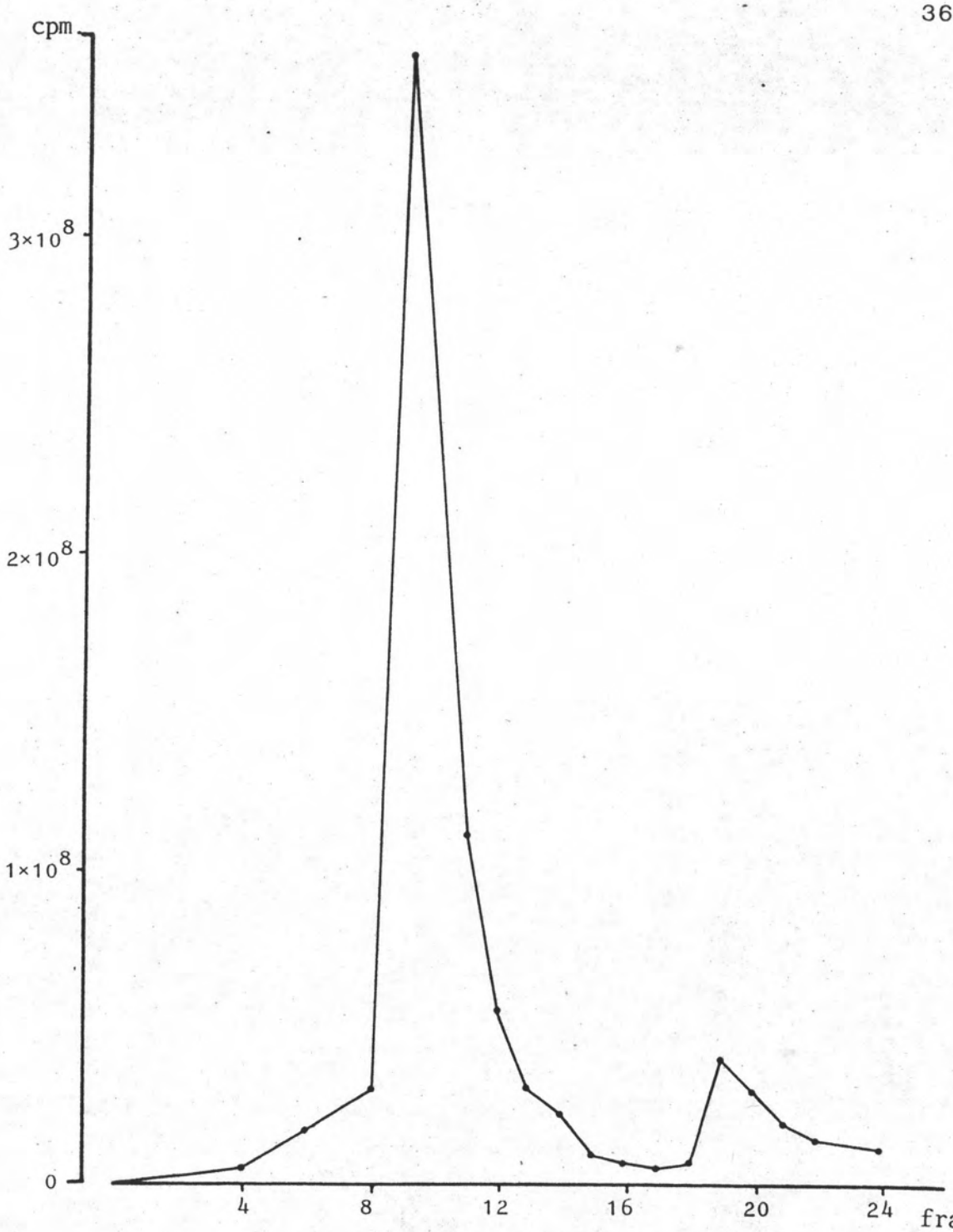
คอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาด 0.8 × 10 ซม. ใส่ลูกแก้วเข้าไปอุดปลายและล้างคอลัมน์ด้วย EDTA-PBS ต่อคอลัมน์เข้ากับเครื่อง Fraction collector เทเซฟาเดกซ์ที่เตรียมไว้ลงไปจนเต็มคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ เซฟาเดกซ์จะค่อย ๆ เรียงตัวในคอลัมน์ซึ่งจะได้ปริมาตรประมาณ 10 มล. ล้างเซฟาเดกซ์คอลัมน์ด้วย gel-PBS 0.05 M. จนเซฟาเดกซ์คอลัมน์อิ่มตัวด้วย gel-PBS 0.05 M. และปริมาตรของเซฟาเดกซ์ไม่ลดต่ำลงอีก ให้เหลือสารละลายอยู่เหนือระดับเซฟาเดกซ์เพียงเล็กน้อย

การติดสลาก rLH ด้วยไอโอดีน-125

วิธีการติดสลาก rLH ด้วยไอโอดีน-125 นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hunter, 1969 ดังนี้ ใช้ Hamilton syringe ดูดสารละลาย

$Na^{125}I$	10 µl (1 mCi)
Chloramine-T	12.5 µl (25 µg)
Sodium metabisulphite	30 µl (30 µg)
transfer solution	100 µl

เติม $Na^{125}I$ ลงใน reaction vial ซึ่งมี rLH-I-6 (AFP-6833C) 5 µg ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M. pH 7.5 50 µl เติม chloramine-T 12.5 µl เขย่าจับเวลาของการเกิดปฏิกิริยา 1 นาที 30 วินาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม sodium metabisulphite 30 µl เขย่าแล้วเติม transfer solution 100 µl นำสารละลายทั้งหมดไปผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-25 ไฟน์ ล้าง reaction vial ด้วย 8% sucrose ใน Gel-PBS ที่มีโปตัสเซียมไอโอไดด์ 0.1% จำนวน 20 มล. เก็บ fraction ทั้งหมด 36 fractions (12 หยด/0.5 มล./4 นาที)



กราฟที่ 1 แสดงปริมาณรังสี (cpm) ที่ตรวจวัดได้ในแต่ละ fraction จากการทำ gel filtration chromatography พบว่า fraction ที่ 9 เป็น ^{125}I-rLH

แบ่งแต่ละ fraction ไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง gamma counter fraction ละ 5 µl แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างปริมาณรังสีและลำดับของ fraction peak แรกจะเป็น rLH ที่ติดสลากด้วย ^{125}I ซึ่งนำมาใช้เป็น tracer ดังในกราฟที่ 1

การคำนวณผลที่ได้จากการติดสลาก rLH ด้วยไอโอดีน-125

ภายหลังจากที่นำแต่ละ fraction ไปตรวจวัดหาปริมาณรังสีและนำมาเขียนกราฟแล้ว ผลของการติดสลาก rLH ด้วยไอโอดีน-125 คำนวณได้ดังนี้

ปริมาณรังสีใน rLH = Total count in [^{125}I] - counts in [^{125}I] iodide peak

= $(1.02 \times 10^9$ 0 $1.35 \times 10^8)$ cpm

= 8.87×10^8 cpm

% Iodination yield = $\frac{\text{counts in protein}}{\text{original counts}} \times 100\ \%$

= $\frac{8.87 \times 10^8 \text{ cpm}}{1.02 \times 10^9 \text{ cpm}} \times 100\ \%$

= 86.96 %

ปริมาณสารรังสีที่เข้าไปใน rLH = $\frac{\text{\% iodination yield} \times \text{original activity}}{100}$

= $\frac{(86.96\ ) \times 1 \text{ mCi}}{100}$

= 869 µCi

Specific activity = $\frac{\text{rLH radio activity}}{\text{มวลของ rLH}}$

= $\frac{869\ \mu Ci}{5\ \mu g}$

= 173.8 µCi/µg

Percentage of total rLH recovered in peak fraction (9) = $\frac{\text{counts in fraciton 9}}{\text{count in rLH}} \times 100\ \%$

= $\frac{3.62 \times 10^8}{8.87 \times 10^8} \times 100\% = 40.81\%$

มวลของ rLH fraction 9 = $\frac{\text{\% of protein in fraction 9} \times \text{mass of protein}}{100}$

= $\frac{40.81 \times 5}{100}\ \mu g = 2.04\ \mu g$ หรือ 2040 ng

การตรวจวัด rLH ด้วยวิธี RIA

การตรวจหาปริมาณ rLH ด้วยวิธี RIA ใช้วิธี Disequilibrium double antibodies radioimmunoassay ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ WHO,1984โดยมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้

การเตรียมสารละลาย

working tracer

tracer buffer เตรียมโดยละลายNormal rabbit serum (NRS) ใน Gel-PBS 0.05 M. pH 7.0 ในอัตราส่วน 1 : 400 ใช้บัฟเฟอร์ที่เตรียมได้นี้เจือจาง tracer ให้มีปริมาณรังสี 30,000 cpm/100 µl

First antibody

ละลาย NRS ใน EDTA-Gel-PBS 0.05 M. pH 7.0 ในอัตราส่วน 1 : 400 เป็น first antibody buffer first antibody ใช้ anti-rLH-S-7 เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1 : 5,000 โดยใช้ anti-rLH-S-7 10 µl ละลายในบัฟเฟอร์ 50 มล. ใช้เติม 100 µl/หลอด ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 : 20,000 แอนติบอดีนี้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

Second antibody

EDTA-PBS 0.05 M. pH 7.0 เป็น second antibody buffer second antibody ใช้ anti-rabbit Ig G. ซึ่งอยู่ในสภาพแห้ง (lyophylized) ละลายด้วยน้ำกลั่น (กลั่นซ้ำ 3 หน) 2 มล. เจือจาง second antibody ด้วยบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1 : 20 เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

Sample หรือ Standard buffer

ใช้ EDTA-Gel-PBS 0.05 M. pH 7.0 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับเจือจางสารตัวอย่างหรือฮอร์โมนมาตรฐาน

การเตรียม rLH มาตรฐาน

ใช้ rLH มาตรฐานเดียวกันกับที่ตรวจวัด rLH โดยวิธีไบโอเสเสย์ (rLH-RP-2) ซึ่งมีความเข้มข้นขวดละ 125 µg/25 µl นำมาเติมด้วย standard buffer ให้เป็น 1 มล. จะได้ rLH มาตรฐานความเข้มข้นแรกเป็น 25 ng/200 µl จากนั้นทำ serial dilution ลงไปอีก 5 ลำดับ จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.78 ng/200 µl

ขั้นตอนการทำ RIA ของ rLH

การตรวจวัด rLH ด้วยวิธี RIA มีขั้นตอนการทำดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3 แสดงการทำ RIA ของ rLH

หลอดทดลอง	Buffer	Tracer	1st Antibody	ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง	2nd Antibody
TC	-	100 µl	-		-
NSB	200 µl	100 µl	100 µl* (buffer)		100 µl
TB_o	200 µl	100 µl	100 µl		100 µl
สารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง	-	100 µl	100 µl		100 µl

หมายเหตุ สารตัวอย่างใช้ 200 µl หรือหากใช้ปริมาตรน้อยกว่านี้ ปรับปริมาตรให้ครบ 200 µl ด้วย standard buffer * เติม 1st Antibody buffer 100 µl.

Quality control ใช้ซีรัมหนูขาวเพศเมีย 200 µl 100 µl และ 50 µl ตามลำดับ ค่าฮอร์โมนที่อ่านได้ในส่วนนี้ต้องนำมาคำนวณเป็น ng/ml. แล้วจึงคำนวณหาเปอร์เซนต์ความแม่นยำ

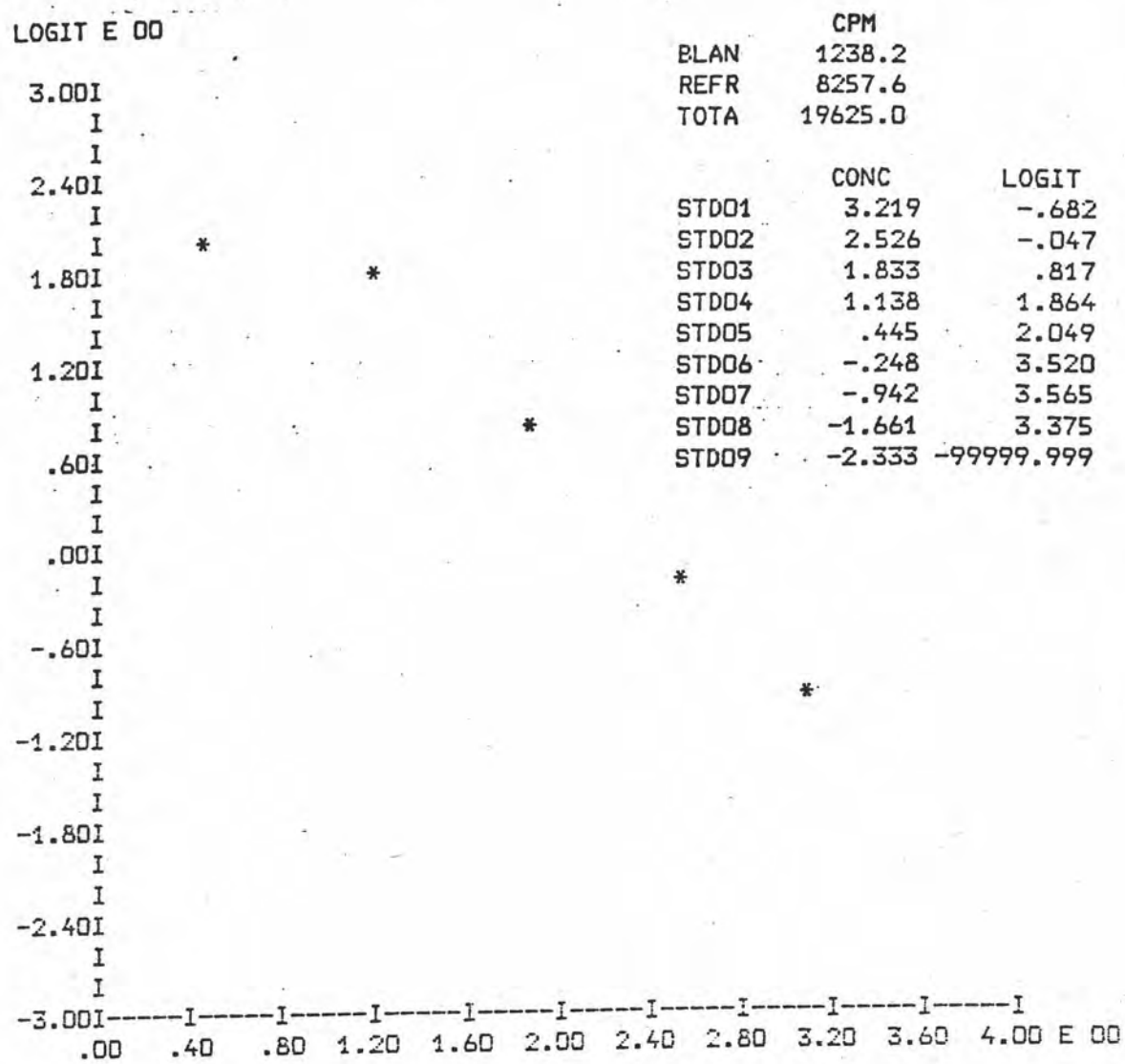
หลังจากเติม 2nd Antibody ตั้งไว้ที่ 4 ซ. ค้างคืนแล้ว ทุกหลอดทดลอง (ยกเว้น TC) นำมาเติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 4 ซ. 3 มล. และนำไปปั่นที่ 2,500 x G (3,200 รอบ/นาที) ที่ 4 ซ. นาน 45 นาที เทส่วนใสทิ้งไป นำตะกอนไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง Gamma counter (LKB Multigamma counter Model 1260 Multigamma II) ซึ่งเครื่องตรวจ

วัดปริมาณรังสีนี้ จะสร้างกราฟมาตรฐานและอ่านค่าปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่างตามแต่โปรแกรมที่ป้อนเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ สำหรับการทดลองของข้าพเจ้านี้เลือกใช้โปรแกรมแบบ Logit transfromation

ค่าปริมาณฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้ในส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมอง ต้องนำมาลบออกด้วยค่ารบกวนของ phenol red ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งหาได้จากการนำ Plain medium ไปลงตรวจวัดด้วย ในการตรวจวัดนี้มีค่า 0.1 ng/200 µl.

การแปลผลทางสถิติ

ปริมาณ rLH ที่ตรวจวัดได้ทั้งวิธีไบโอเอสเสย์ RIA และอัตราส่วน BA: RIA ของ rLH นำมาตรวจหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้ Duncan's Multiple range test โดยมีระดับความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$



QC DATA (100%=REFR)

	CPM	CONC
1.00	8257.6	.097
0.80	6606.1	4.284
0.50	4128.8	12.036
0.20	1651.5	25.000

B/T .0631 R/T .4208

DATE..18/6/85.....TIME 13:44 RUN BY..SATHAPORN.....

กราฟที่ 2 ตัวอย่างกราฟมาตรฐาน logit transformation ของ rLH ที่ตรวจวัดด้วยวิธี RIA จาก computer program ของ Gammar Counter คำนวณจากเครื่อง facit 4200 Parameter NO.13