หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

สัตว์ทดลอง สารเคมี อุปกรณ์และการทดลอง

สัตว์ทดลอง

1. หนูขาว(albino rat)(Rattus norvigicus) พันธุ์ wistar
   1.1 เพศผู้อายุ 23-25 วัน จำนวน 50 ตัวเพื่อใช้เซลล์ต่อมใต้สมองมาเพาะเลี้ยง
   1.2 เพศเมียอายุ 26 วัน จำนวน 40 ตัวเพื่อใช้ granulosa cell ในการหาไบโอแอคติวิตีของฮอร์โมน FSH (bioassay FSH)
2. ลิงแสม (Macaca fascicularis)

สถานที่เลี้ยง

ใช้ห้องเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยปรับอากาศให้อุณหภูมิห้องประมาณ 25°ซ.และควบคุมแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมงระหว่างเวลา 06.00-20.00 น. โดยเครื่องควบคุมอัตโนมัติพร้อมทั้งให้อาหารและน้ำดื่มตลอดเวลา ส่วนลิงแสมใช้เรือนเลี้ยงลิงของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลิงแต่ละตัวเลี้ยงไว้ในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิมขนาดกว้าง 24 นิ้ว สูง 34 นิ้วและลึก 28 นิ้ว อยู่ในเรือนเลี้ยงลิงที่โล่ง กรุด้วยลวดตาข่ายและมุ้งลวด อากาศถ่ายเทได้สะดวก อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารจำพวกกล้วย มันเทศ แตงกวา สับปะรดและอาหารสำเร็จรูปของบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้งเวลา 08.00-09.00 น.และ 15.00-16.00 น. นอกจากนี้ยังให้ไข่ต้ม 1 ฟองต่อ 1 ตัวต่อ 1 อาทิตย์

ห้องปฏิบัติการ

1. เรือนเลี้ยงหนูและเรือนเลี้ยงลิงของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาว

1.1 Minimal Essential Medium (MEM): cat. no. 410-1100 W/O $NaHCO_3$, Gibco, Grand Island Biological Company, Grand Island, New York, 14072, U.S.A..

1.2 Dubbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): cat. no. 430-1600 W/O $NaHCO_3$ from Gibco Laboratories, Life Technologies,Inc. Chargrin Falls, Ohio,44o22, U.S.A..

1.3 HEPES (N-2-Hydroxyethyl piparazine-N'-2-ethane sulfonic acid. M.W.238.3: No. H-3375, Sigma Chemical Company, St. Louis, 14508, U.S.A..

1.4 $NaHCO_3$: GR. M.W. 84.01, E. Merck, Germany.

1.5 Penicillin-Streptomycin solution (Penicillin 10,000 U/ml. Streptomycin 10.000 ug/ml.): cat.# 600-5140, Gibco Laboratories Inc. Chargrin Falls, Ohio,44022,U.S.A..

1.6 Fungizone (Amphotericin B-250 ug/ml.): cat.# 600-5295, Grand Island Biological Company, Grand Island, New York, 14072, U.S.A..

1.7 Fetal bovine serum (FBS): cat. no. 200-6140, Grand Island Biological Company,manufactural by Gibco, New Zealand LTD.

1.8 Horse serum (HS): cat. no. 200-6050, Gibco Laboratories Life Technologies, Inc. Chargrin Falls, Ohio,44022,U.S.A..

1.9 Bovine serum albumin(BSA), fraction V : cat. no.A:4378, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. 63178, U.S.A..

1.10 Trypsin (2.5%) cat. no. 610-5095, Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc. Chargrin Falls,Ohio, 44022,U.S.A..

1.11 Luteinizing hormone-Releasing hormone (LH-RH ,GnRH) (p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2-2AcOH): No. L-0507, M.W. 1302.4, Sigma Chemical Company, St. Louis.,MO. 63178, U.S.A..

2. สารเคมีสำหรับหาระดับของ FSH โดยวิธี bioassay

2.1 M 199 : cat. no. E-11, Gibco, Grand Island Biological Company, Grand Island, New York, 14072, U.S.A..

2.2 HEPES : No. H-3375 , Sigma Chemical Company , St. Louis, 14508, U.S.A..

2.3 $NaHCO_3$: E. Merck, M.W. 84.01 , Germany .

2.4 Penicillin-Streptomycin solution (Penicillin 10,000 U/ml. Streptomycin 10,000 ug/ml.) : cat. no. 600-5140, Gibco Laboratories, Life Technologies , Inc., Chargrin Falls , Ohio , 44022 , U.S.A..

2.5 Bovine serum albumin (BSA) fraction # V : cat. no. A-4378, Sigma Chemical Company, St. Louis., MO. 63178, U.S.A..

2.6 Fetal bovine serum (FBS) : cat. no. 200-6140, Gibco, New Zealand, Ltd.

2.7 Fibrinogen, 96 % clottable : Sigma Chemical Company, St. Louis., MO. 63178 , U.S.A..

2.8 Lysine-Sepharose 4 B : No.(-G132), Sigma Chemical Company , St. Louis., MO. 63178 ,U.S.A..

2.9 PMSG. (2000 IU.): Sigma Chemical Company, St. Louis., MO. 63178 , U.S.A..

2.10 NaI^{125} : batch no.488 , Amersham International plc., England.

2.11 Sephadex G-25 fine : code no. 17-0032-01 , Pharmacia Fine Chemical , Uppsala, Sweden.

2.12 Chloramine-T (trihydrate) : E. Merck , Germany.

2.13 Sodium meta-bisulfite : No. 1-3552 , J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg , New Jersey , 08865.

2.14 Sucrose : AR., May & Baker Ltd., England.

2.15 Potassium iodide : AR., May & Baker Ltd., England.

2.16 Sodium dihydrogen phosphate(NaH_2PO_4) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

2.17 Disodium hydrogen phosphate(Na_2HPO_4) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

2.18 Sodium chloride (Nacl) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

2.19 Charcoal reagent : batch: 82/83/R, WHO. RIA. reagent program.

2.20 Dextran reagent : batch : 82/83/R , WHO. RIA. reagent program.

2.21 Sulfuric acid conc^{n} (H_2SO_4) BDH. Chemical Ltd.

2.22 Sodium hydroxide (NaOH), granular AR : BDH Chemical Ltd.

2.23 EDTA , M.W. 372.2; No. 18993, J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, New Jersey , 08865.

2.24 Rat Follicle stimulating hormone (rFSH) reference preparation, NIADDK-rFSH-RP-2 (AFP-4621B); International Institute of Arthrites, Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIADDK), Pituitary Hormone & Antisera Center, California, 09509.

2.25 Gelatin ; Difco Laboratory.

2.26 Thiomersal (ไทโอเมอร์ซอล) : No. T-5152 Sigma Chemical Company, St. Louis., 14508, U.S.A..

3. สารเคมีสำหรับหาระดับของ FSH โดยวิธี radioimmunoassay

3.1 Rat Follicle stimulating hormone antigen, NIADDK--rFSH-I-6 (AFP-6679B) ; NIADDK, Pituitary Hormone & Antisera Center, California , 90509.

3.2 Rat Follicle stimulating hormone antiserum (rabbit), NIADDK-anti-rFSH-S-11 (AFP-CO 972881); NIADDK, Pituitary Hormone & Antisera Center , California , 90509.

3.3 Donkey anti-rabbit serum : WHO. RIA. reagent program.

3.4 Sodium dihydrogen phosphate(NaH_2PO_4) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

3.5 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

3.6 Sodium chloride (NaCl) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

3.7 Thiomersal : No. T-5152, Sigma Chemical Company, St. Louis., 14508, U.S.A..

3.8 Gelatin : Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A..

3.9 EDTA , M.W. 372.2 : No. 1-8993 , J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg , New Jersey , 08865.

3.10 NaI^{125} (5 mCi in 50 ul) : batch no. 48B., Amersham International plc. England.

3.11 Chloramine-T (trihydrate) : E. Merck, Darmstadt,Germany.

3.12 Sodium meta-bisulfite : No. 1-3552, J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, New Jersey , 08865.

3.13 Sephadex G-25 fine : code no.: 17-0032-01 , Pharmacia Fine Chemical , Uppsala , Sweden.

3.14 Sucrose , AR. Grade ; May & Baker Ltd., England.

3.15 Potassium iodide, AR.; May & Baker Ltd., England.

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งละเอียด : Right A. Weight, W.M. Ainsworth & Son Inc., U.S.A..
2. เครื่องชั่งทยาบ : Mettler E. 200, Mettles Instrument Switzerland.
3. Micropipetteman, M 81 : Gilson France, Eppendorf 3130, Germany ; Pipette Gun Clay Adam, U.S.A..
4. Dubnoff-metabolic shaker incubator : 17-AD-S, Precision Scientific Chicago , Illinoi , U.S.A..
5. Magnetic stirrer : S-18520, Thermolyne Corporation, Iowa, U.S.A..
6. Mixer : M.16715, Thermolyne Coporation, Iowa, U.S.A..
7. pH meter : 5985, Cole Parmer Instrument Company, Chicaco, Illinoi, 60648 , U.S.A..
8. Refrigerated centrifuge : model PR-J, International Equi--ment Company Mass., U.S.A..
9. Gamma counter : LKB-Wallac, No.1260 , efficiency 80%.
10. Dynac centrifuge : Clay adam, Becton Dickinson & Company Parisppany, New Jersey, 07054.
11. Fraction collector : model 1850, Instrumentation Specialtic Company, Lincoln, Nebraska, 68505, U.S.A..
12. Sterilizer : model STM-E, Market Forge Co. Everett, Mass., U.S.A..
13. ตู้อบแห้ง : Drying cabinet: series 2000 Tremaks, U.S.A..
14. Laminar flow hood : serial no. NBB-193 , Bellco Glam Inc., Vineland , New Jersey , 08360.
15. Incubator : UN-1-Trol-CO_2 incubator, model 329 , Forma scientific marietta, Ohio.
16. Dessicator with pump.

17. Millipore : cat. no. S x 0002500, Millipore corp-Bedford, Mass., 01730.
18. Millipore size 0.22 u : cat. no. G-SW-P-04700, Millipore corp-Bedford, Mass., 01730.
19. Millipore size 0.45 u : cat. no. G-SW-P-02500, Millipore corp-Bedford , Mass., 01730.
20. Bellco Dissociating flask.
21. Multiwell tissue culture plate : Falcon , Sweden.
22. Nylon mesh (nitex 102).

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

1.1 หนูขาว

การตรวจวงอีสตรัส ใช้หนูขาวเพศเมียอายุ 2-4 เดือนโดยมีวงจรอีสตรัสเป็นปกติต่อเนื่องกัน 1 รอบโดยทำสเมียร์จากช่องคลอดตามวิธีดัดแปลงจากวิธีของ Long และ Evan (1922) โดยใช้แท่งแก้วปลายมนทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % แล้วจุ่มในน้ำเกลือ 0.9 % สอดเข้าภายในช่องคลอดให้ปลายแท่งแก้วแตะกับผนังช่องคลอดเบาๆแล้วนำมาแตะบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทัศน์ว่าเป็นเซลล์ชนิดใดและบันทึกผล

การผสมพันธุ์ การตรวจการตั้งครรภ์และการเลี้ยงลูกอ่อน

เมื่อทำการตรวจวงอีสตรัสโดยดูจากเซลล์ช่องคลอด เราเลือกหนูที่มีเซลล์จากช่องคลอดเป็น nucleated epithelial cells ซึ่งแสดงว่าหนูนั้นอยู่ในระยะโปรอีสตรัส ระยะนี้แม่พันธุ์จะยอมให้ตัวผู้ผสม จะตรงกับเวลาที่ไข่จะตกภายในช่วง 24 ช.ม. นำหนูเหล่านี้ใส่ในกรงหนูพ่อพันธุ์ต่อแม่พันธุ์ในอัตราส่วน 1: 2 ตัวหรือ 1 :1 ตัวทิ้งไว้ 1 คืน วันรุ่งขึ้นตรวจหาสเปอร์มจากสเมียร์ของช่องคลอดเช่นเดียวกัน ถ้าพบสเปอร์มจะเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ (D_1) วันต่อไปจะเป็น D_2 , D_3 ,..... ถ้าสเมียร์ต่อไปจะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวติดต่อกันไปตลอดการตั้งครรภ์ อาจจะพบเซลล์อื่นบ้างเล็กน้อยแต่ถ้าพบ cornified epithelial cells จำนวนมากภายหลังพร้อมกับการตกผลึกซึ่งจะเป็นสัญลักษณ์ของการแท้ง

011930

หนูขาวใช้เวลาท้องนานประมาณ 21-23 วัน เมื่อถึงวันที่ 17-18 ของการตั้งครรภ์ แยกหนูที่ท้องออกเป็นกรงละ 1 ตัว หลังจากคลอดแล้ว 10 วันเลือกลูกหนูตัวผู้หรือลูกหนูตัวเมียให้อยู่กับแม่พันธุ์คลอกละ 7 ± 1 ตัวเพื่อให้ลูกหนูที่จะใช้ในการทดลองมีสุขภาพสมบูรณ์โดยให้ดูดนมถึงก่อนวันทำการทดลอง 1 วัน

1.2 การคัดเลือกลิงแสม

ใช้ลิงแสมที่เลี้ยงในเรือนเลี้ยงลิงของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลิงแสมที่ใช้เป็นลิงที่มีสุขภาพสมบูรณ์ที่ไม่ผ่านการทดลองหรือการให้ยาใดใดทั้งสิ้น ในลิงเพศเมียระยะโตเต็มวัย (S_3) เป็นลิงที่ถูกตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง แบ่งลิงแสมออกเป็นกลุ่มต่างๆ 3 ช่วงอายุ ดังนี้

ระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์(immature)(S_1)	เพศผู้อายุ 1 ปี 7 เดือน	1 ตัว
	เพศเมียอายุ 1 ปี 6 เดือน	3 ตัว
ระยะก่อนวัยรุ่น (adolescent)(S_2)	เพศผู้อายุ 3 ปี	2 ตัว
	เพศเมียอายุ 3 ปี 6 เดือน	2 ตัว
ระยะโตเต็มวัย (adult)(S_3)	เพศผู้อายุ 7 ปี	1 ตัว
	เพศเมียอายุ 8 ปีถูกตัดรังไข่แล้ว	1 ตัว

2. การเก็บเซรั่ม

เจาะเลือดลิงแสมตามช่วงอายุดังกล่าวโดยเจาะเลือดจาก femoral vein ครั้งละ 3 มล. ระหว่างเวลา 09.00-10.00 น. สัปดาห์ละ 2 ครั้ง (วันจันทร์และวันศุกร์) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เลือดที่เจาะแต่ละครั้งเก็บไว้ 1 คืนที่ 4° ซ. นำไปปั่นที่ 2500 rpm นาน 30 นาทีที่ 4° ซ. แยกเซรั่มไปเก็บไว้ที่ -20° ซ. เมื่อครบ 8 สัปดาห์นำเซรั่มของลิงแสมเพศและอายุในระยะเดียวกันมารวมกันและเก็บไว้ที่ -20° ซ. จนกว่าจะทำการศึกษาผลของเซรั่มดังกล่าวต่อการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองของหนูขาว

3. สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม

3.1 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับแยกเซลล์ต่อมใต้สมอง

ละลาย MEM 1.14 กรัมและโซเดียมไบคาร์บอเนท 0.035 กรัมในน้ำกลั่น(ที่กลั่นซ้ำ 3 หน) ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มล.

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ทุกครั้งที่ใช้จะต้องละลาย 0.1 % BSA และ 0.1 % trypsin แล้วกรองผ่าน millipore ขนาด 0.22 u

3.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมอง

ละลาย MEM 20 กรัม HEPES 11.95 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนท 7.4 กรัมในน้ำกลั่น เติมสารละลายเพนนิซิลิน-สเตรพโตรมัยซิน 5.0 มล. fungizone 0.4 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,750 มล. กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดผ่าน millipore ขนาด 0.22 u เติม HS 200 มล. FBS 50 มล. ปริมาตรสุทธิของ DMEM เป็น 2 ลิตร แบ่งใส่ขวดเล็กขนาด 100 มล. เก็บไว้ที่ 4°ซ.

3.3 อาหารสำหรับเลี้ยง granulosa cell

ละลาย M 199 0.992 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนท 0.035 กรัม HEPES 0.596 กรัมในน้ำกลั่น เติมสารละลายเพนนิซิลิน-สเตรพโตรมัยซิน 1 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. เก็บไว้ที่ 4°ซ. ทุกครั้งที่ใช้นำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้มาเติม 0.2% BSA แล้วกรองผ่าน millipore ขนาด 0.22 u ก่อนใช้

การเตรียมสารละลายสำหรับติดสลาก FSH ด้วย I^{125} และ FSH-RIA

1. โมโนเบสิค โซเดียมฟอสเฟต (0.5 M.)

ละลาย โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 69.0 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล. เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

2. ไดเบสิค โซเดียมฟอสเฟต (0.5 M.)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 71.5 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล. เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3. โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (PB 0.5 M., pH 7.5)

เติมไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (0.5 M.)ลงในโมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (0.5 M.) จน pH เป็น 7.5 (ประมาณ 195-200 มล.) เก็บไว้ที่ -20°ซ. แบ่งนำออกมาใช้เมื่อทำการติดสลากฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125

4. โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (PB 0.5 M. , pH 7.5)

เจือจางโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 M. ด้วยการเติมน้ำกลั่นลงไปในโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 M. 50 มล. จนปริมาตรครบ 500 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

5. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาไลน์ (PBS 0.05 M., pH 7.0)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 143.0 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล. เติมโมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต 0.5 M. 151 มล. ไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต 0.5 M. 239 มล. และไทโอเมอร์ซอล 1.75 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 17.5 ลิตร

6. EDTA-PBS (0.05 M., pH 7.0)

ละลาย EDTA 18.0 กรัมใน PBS 800 มล. โดยนำไปอุ่นบน hot plate ปรับ pH ให้ได้ 7.0 เติมจนครบ 1 ลิตรด้วย PBS 0.5 M. เก็บไว้ที่ 4°ซ. ได้นาน 6 เดือน

7. Gel-PBS (0.05 M., pH 7.0)

ละลายเจลาติน 1 กรัมใน PBS 1 ลิตร โดยนำไปอุ่นบน hot plate เก็บไว้ที่ -20°ซ. ได้นาน 6 เดือน ทุกครั้งที่นำออกมาใช้ให้ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ก่อนทุกครั้ง

8. สารละลายคลอรามีน-ที (40 ug / 20 ul)

ชั่งคลอรามีน-ที (ไตรไฮเดรท) 100 มก. ใส่ใน volumetric flask 50 มล. และเติม 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 จนครบ 50 มล. เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง

9. สารละลายโซเดียมเมต้าไบซัลไฟท์

ชั่งโซเดียมเมต้าไบซัลไฟท์ ($Na_2S_2O_5$) 100 มก. ใส่ใน volumetric flask 50 มล. เติม 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 จนครบ 50 มล. ผสมให้ละลายและเตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง

10. 16% ซูโครสในสารละลาย PBS-Gel ที่มีโปตัสเซี่ยมไอโอไดด์ 1%

ชั่งซูโครส 16 กรัมละลายในสารละลาย PBS-Gel 0.05 M. pH 7.0 ที่มีโปตัสเซี่ยมไอโอไดด์ละลายอยู่ 1% เก็บแช่เย็นไว้จนกว่าจะใช้

11. 8% ซูโครสในสารละลาย PBS-Gel ที่มีโปตัสเซี่ยมไอโอไดด์ 1%

ชั่งซูโครส 8 กรัมละลายในสารละลาย PBS-Gel 0.05 M. pH 7.0 ที่มี

โปตัสเซี่ยมไอโอไดด์ละลายอยู่ 1% เก็บแช่แข็งไว้จนกว่าจะใช้

การเตรียมสารละลายสำหรับติดฉลากไฟบริโนเจนด้วย I^{125}

1. สารละลายไฟบริโนเจน (200 ug / 50 ul)

ชั่งไฟบริโนเจน (96% clottable) 2 มก.ละลายใน 0.5 M. ฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ pH 7.5 0.5 มล. ผสมให้ละลายให้หมด เก็บแช่แข็งไว้จนกว่าจะใช้

2. สารละลายคลอรามีน-ที (20 ug / 15 ul)

ชั่งคลอรามีน-ที 67.5 มก.ละลายใน 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH7.5 จนครบ 50 มล.ใน volumetric flask เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง

3. สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์

เหมือนข้อ 9 ในการเตรียมสารละลายสำหรับการติดฉลาก FSH ด้วย I^{125}

4. 16% ซูโครสในสารละลาย PBS-Gel ที่มีโปตัสเซี่ยมไอโอไดด์ 1%

เหมือนข้อ 10 ในการเตรียมสารละลายสำหรับการติดฉลาก FSH ด้วย I^{125}

5. 8% ซูโครสในสารละลาย PBS-Gel ที่มีโปตัสเซี่ยมไอโอไดด์ 1%

เหมือนข้อ 11 ในการเตรียมสารละลายสำหรับการติดฉลาก FSH ด้วย I^{125}

การเตรียมสารละลาย สำหรับฮอร์โมน FSH ด้วยวิธีไบโอเอสเส

1. การเตรียม plasminogen depleted FBS (Deutsch, D.G. และ Mertz, E.T. , 1970)

1.1 ใช้ไลซีน-เซฟาโรสที่อิ่มตัวด้วย 0.1 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยการแช่ค้างคืน

1.2 นำไปดูดอากาศออกให้หมดด้วยเครื่องซัคชั่น เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศเวลาเตรียมคอลัมน์

1.3 เตรียมโครมาโตกราฟิคคอลัมน์ ยาวประมาณ 30 ซ.ม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซ.ม. โดยใช้ไลซีน-เซฟาโรสที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.1

1.4 ล้างด้วยบัฟเฟอร์จนเซฟาโรสอัดตัวเข้าที่ดี แล้วผ่าน FBS ตามหน้า 11

จำนวน 20 มล.ลงในคอลัมน์โดยให้อัตราการไหล 20 มล.ต่อ 1 ช.ม.

1.5 เติมผงถ่านที่ผสมด้วยเดกซ์แตรน นอร์ริทในอัตราส่วน 2.5 : 0.25 : FBS 100 ส่วน เพื่อดูดซับสเตียรอยด์ที่อาจมีปนอยู่บ้างเล็กน้อยออกโดยทิ้งไว้ตลอดคืนที่ 4°ซ.

1.6 นำมาปั่นที่ 2500 rpm 4°ซ.นาน 20 นาที

1.7 นำ plasminogen depleted FBS ที่ดูดซับด้วยผงถ่านแล้วมากรองผ่าน millipore ขนาด 0.45 u

1.8 เก็บแช่แข็งไว้จนกว่าจะใช้

2. การเตรียม acid treated FBS.

2.1 นำ FBS (ตามหน้า 11) มาปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริค (HCl) 10 N. ให้มี pH 3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ช.ม.

2.2 เมื่อครบ 2 ช.ม.แล้วนำมาปรับให้มี pH 7.3 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 N.

2.3 นำมาเติมผงถ่านด้วยเดกซ์แตรน นอร์ริท ในอัตราส่วน 2.5 : 0.25 : FBS 100 ส่วน เพื่อดูดซับสเตียรอยด์ที่อาจมีปนอยู่บ้างเล็กน้อยออกไป ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°ซ. 1 คืน

2.4 นำมาปั่นที่ 2500 rpm 4°ซ. นาน 20 นาที

2.5 นำ acid treated FBS ที่ผ่านผงถ่านแล้วมากรองผ่านmillipore ขนาด 0.45 u

2.6 เก็บแช่แข็งไว้จนกว่าจะใช้

3. การเตรียม M 199 + 10% plasminogen depleted FBS

ชั่ง M 199 0.992 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนท 0.035 กรัมและ HEPES 0.596 กรัมละลายในน้ำกลั่น (ชนิดกลั่น 3 ครั้ง) เติมสารละลายเพนนิซิลิน-สเตรพโตรมัยซิน 1.000 ม.ล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.3-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 90 ม.ล. แล้วกรองผ่าน millipore ขนาด 0.22 u แล้วเติม plasminogen depleted FBS ที่เตรียมไว้ 10 ม.ล. เก็บไว้ที่ 4°ซ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเตรียม M 199 + 10% acid treated FBS

วิธีการเตรียมเหมือนวิธีการเตรียม M 199 + 10% plasminogen depleted FBS ตามข้อ 3 แต่ใช้ 10% acid treated FBS แทน 10% plasminogen depleted FBS

การแยกเซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาว

การแยกเซลล์และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าดัดแปลงจากวิธีของ Hymer , 1975 ดังนี้คือ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูขาวเพศผู้อายุ 23-25 วัน ใช้กรรไกรตัดคอหนูขาวแล้วเปิดกระโหลกและผลิกสมองขึ้นทั้งหมด จะพบเยื่อ sella diaphragm คลุมต่อมใต้สมองซึ่งอยู่ในเบ้า sella turnica ของ sphenoid bone ใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% และลนไฟ ปล่อยให้เย็น เขี่ยแยก sella diaphragm ออกจะเห็นต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ตรงกลางของต่อม ใช้ปากคีบแยกเอาส่วนนี้ออกทิ้งไปแล้วใช้ปากคีบช้อนต่อมใต้สมองส่วนหน้านี้ออกมาล้าง 2 ครั้งใน Minimal Essential Medium (MEM)ซึ่งมี BSA 0.1% โซเดียม-ไบคาร์บอเนต 0.035% เพนนิซิลิน 50 U/ml. และสเตรพโตรมัยซิน 50 ug/ml. pH 7.2 ใช้ใบมีดโกนสับและตัดต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้ละเอียด นำกลุ่มเซลล์เหล่านี้ใส่ใน Bellco dissociating flask ที่มี MEM 10 ม.ล.และ trypsin 0.1% ซึ่งวางอยู่ใน Dubnoff metabolic shaker incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ. และทุกๆ 10 นาทีใช้ pasture pipette ที่ปลอดเชื้อดูดสารละลาย(MEM)ดังกล่าวขึ้นลง 20 ครั้งเพื่อช่วยให้เซลล์แยกกันดีขึ้น เมื่อครบ 30 นาทีแล้วกรองเซลล์ผ่าน nylon mesh (nitex 102)เพื่อแยกเอาเนื้อเยื่อที่ถูกย่อยออกจากเซลล์เดี่ยวๆ นำเซลล์ในMEM ที่กรองแล้วไปปั่นที่ 100 G (1500 r p m.) นาน 10 นาทีแล้วดูด MEMทิ้งไป นำกลุ่มเซลล์ที่ได้ไปทำให้กระจายอีกครั้งใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)ที่มี HS 10% FBS 2.5% เพนนิซิลิน 50 U/ml. สเตรพโตรมัยซิน 50 ug/ml. และ fungizone 0.05 ug/ml แล้วนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทัศน์ phase-contrast โดยใช้ hemacytometer จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่ในถาดพลาสติดหลุมเลี้ยงเซลล์จำนวน 10^5 เซลล์/อาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ม.ล./หลุม นำถาดเลี้ยงเซลล์ใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°ซ. และอิ่มตัวด้วยไอน้ำในอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ผสมอยู่ 5 % นาน 48 ช.ม.

การทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของเซรั่มลิงแสมระยะต่างๆ

เมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ครบ 48 ช.ม. แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่โดยไม่เติมเซรั่มลิงแสมเป็นกลุ่มควบคุม 3 ตัวอย่างและเติมเซรั่มลิงแสมระยะ S_1 ตัวผู้และตัวเมีย ระยะ S_2 ตัวผู้และตัวเมีย และ S_3 ทั้งตัวผู้และตัวเมียในปริมาณ 120 ul /DMEM 2 มล (เท่ากับความเข้มข้น 6%) นำไปบ่มเลี้ยงที่ 37°ซ. ในตู้บ่มที่มีอากาศผสมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอิ่มตัวด้วยไอน้ำ เมื่อครบ 24,48 และ 72 ช.ม. เก็บและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จากแต่ละหลุมด้วยวิธีปั่น แล้วนำไปเก็บที่ -20°ซ. เพื่อไว้ตรวจหาปริมาณฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี BA และ RIA ต่อไป ขั้นตอนการทดลองแสดงตามไดอะแกรมรูปที่ 3

การทดลองที่ 2 ผลของ GnRH

1. เมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวครบ 48 ช.ม. แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากปั่นเซลล์ออกแล้ว เป็นกลุ่มพรีอินคิวเบชั่น

2. แบ่งการทดลอง เป็น 2 กลุ่ม กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มควบคุม 3 ตัวอย่างไม่เติม GnRH อีกกลุ่มหนึ่ง 3 ตัวอย่างเติม GnRH 20 นก./ DMEM 10 มล./หลุม ความเข้มข้นในหลุมจะเท่ากับ 0.2 นก./หลุม

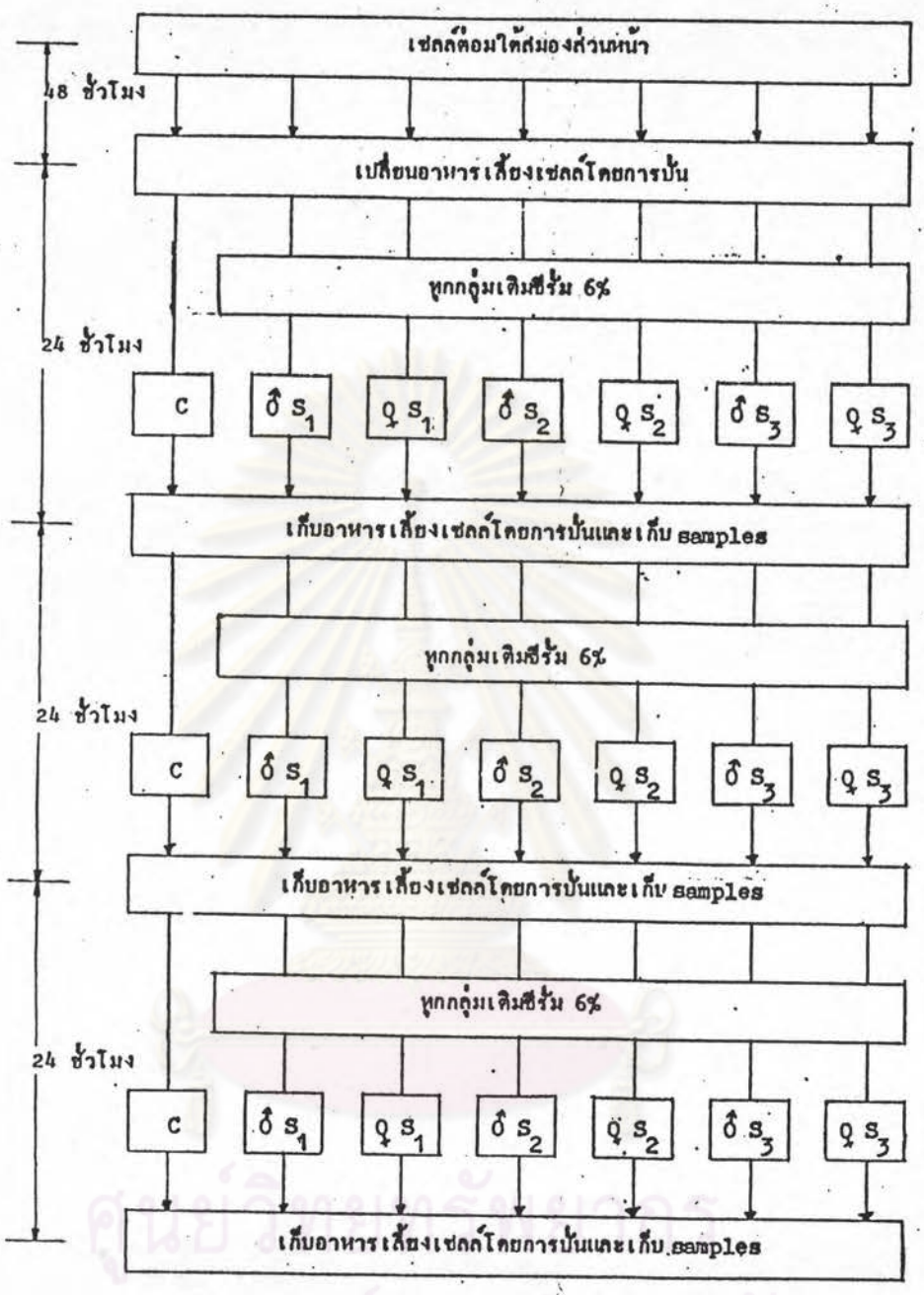
3. เติม DMEM ทุกหลุมให้ครบ 2 มล. และนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในตู้บ่มที่มีอากาศผสมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอิ่มตัวด้วยไอน้ำ เมื่อครบ 24,48 และ 72 ช.ม. เก็บและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมด้วยวิธีปั่นเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 ผลของ GnRH รวมกับเซรั่มลิงแสมระยะต่างๆ

1. เมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวครบ 48 ช.ม. แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากปั่นเซลล์ออกแล้วเป็นกลุ่มพรีอินคิวเบชั่น

2. แต่ละหลุมใส่ GnRH 10 ul ที่มีความเข้มข้น 20 นก./มล.

3. กลุ่มควบคุมเติม DMEM ให้ครบ 2 มล. ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเติม 6% เซรั่มลิงแสมระยะ S_1 ตัวผู้และตัวเมีย ระยะ S_2 ตัวผู้และตัวเมีย และระยะ S_3 ตัวผู้และตัวเมียโดยเติมในปริมาณ 120 ul / 2 มล.



รูปที่ 3 การทดลองที่ 1 แผนผังแสดงการเติมเซรั่มลิงแสม 6% ที่ระยะต่างๆ ในการเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวเพศผู้อายุ 23–25 วัน

C = กลุ่มควบคุม

4. นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เหมือนเดิม เก็บและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24, 48 และ 72 ช.ม.ตามลำดับเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ขั้นตอนการทดลองแสดงตามไดอะแกรมรูปที่ 4

การทดลองที่ 4 ผลของเซรั่มลิงแสม หลังทำไดอะไลซิส

การแยกส่วนเซรั่มลิงแสม

1. ดูดเซรั่มลิงแสมเพศผู้ระยะ S_2 ใส่ในหลอดสำหรับทำไดอะไลซิสที่ยอมให้ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 12,000 ดาลตันผ่านออกจำนวน 6 มล. ผูกหัวท้ายหลอดให้แน่น

2. ทำไดอะไลซิสกับ HEPES บัฟเฟอร์ (0.025 M. HEPES +โซเดียมไบคาร์-บอเนต 0.05 M.)จำนวน 84.5 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. 24 ช.ม.

3. เมื่อครบ 24 ช.ม. เก็บเอาส่วนของเซรั่มที่มีอยู่ในหลอดที่ทำไดอะไลซิสไว้ที่ -20°ซ. เป็นส่วนนอน-ไดอะไลเซเบิล (ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง) ซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อไป

4. ส่วนไดอะไลเสทและส่วนนอน-ไดอะไลเซเบิลนำมาเติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นอย่างละ 6 %

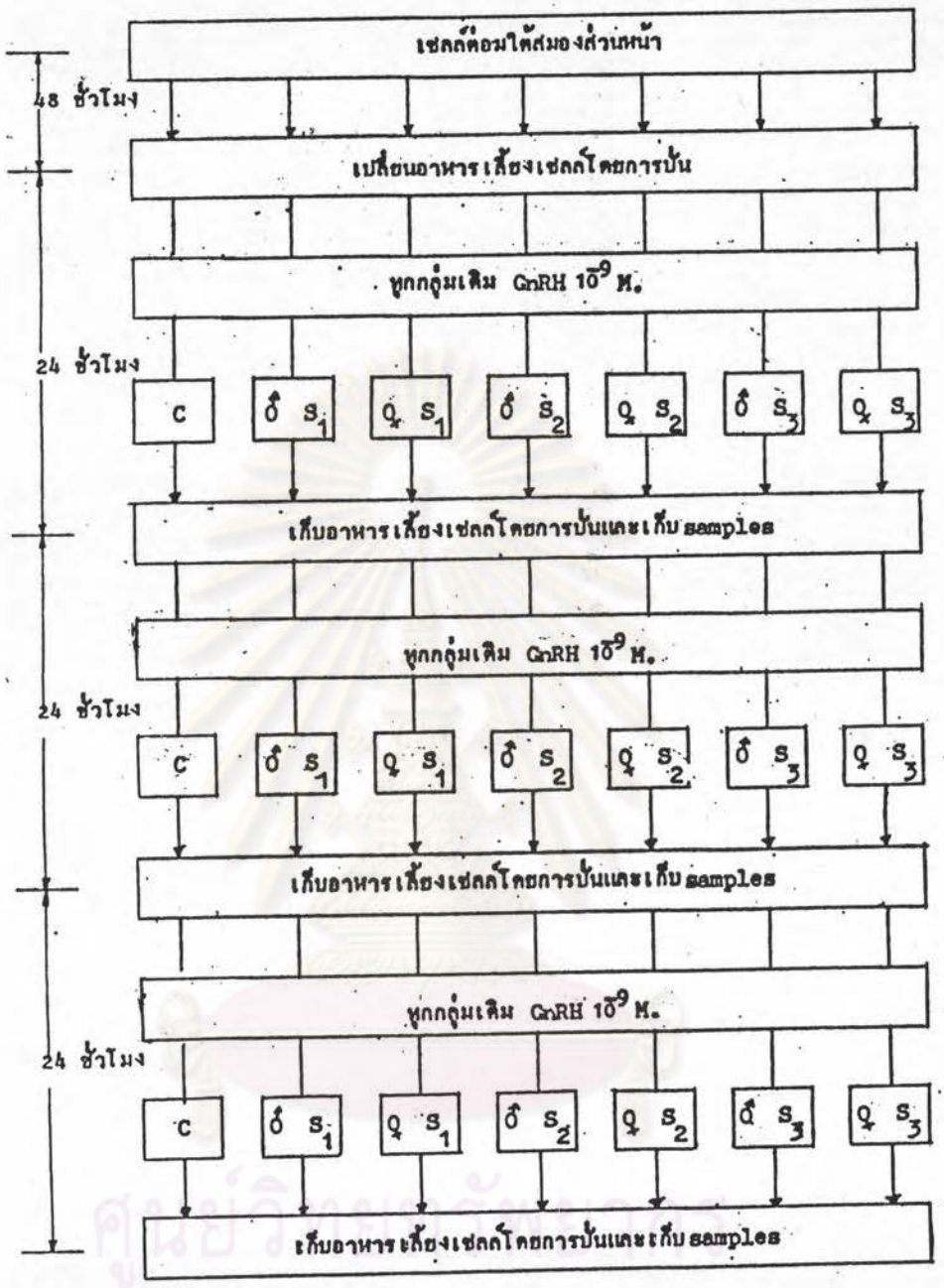
การทดสอบส่วนของเซรั่มลิงแสม

ดำเนินการเหมือนการทดลองที่ 1 แต่ใช้ส่วนไดอะไลเสทของเซรั่มระยะ S_2 6% และส่วนนอน-ไดอะไลเซเบิลของเซรั่มระยะ S_2 6% ใส่แทนเซรั่มลิงแสมระยะต่างๆ ขั้นตอนการทดลองแสดงตามไดอะแกรมรูปที่ 5

การติดสลากฮอร์โมน FSH ด้วย ^{125}I

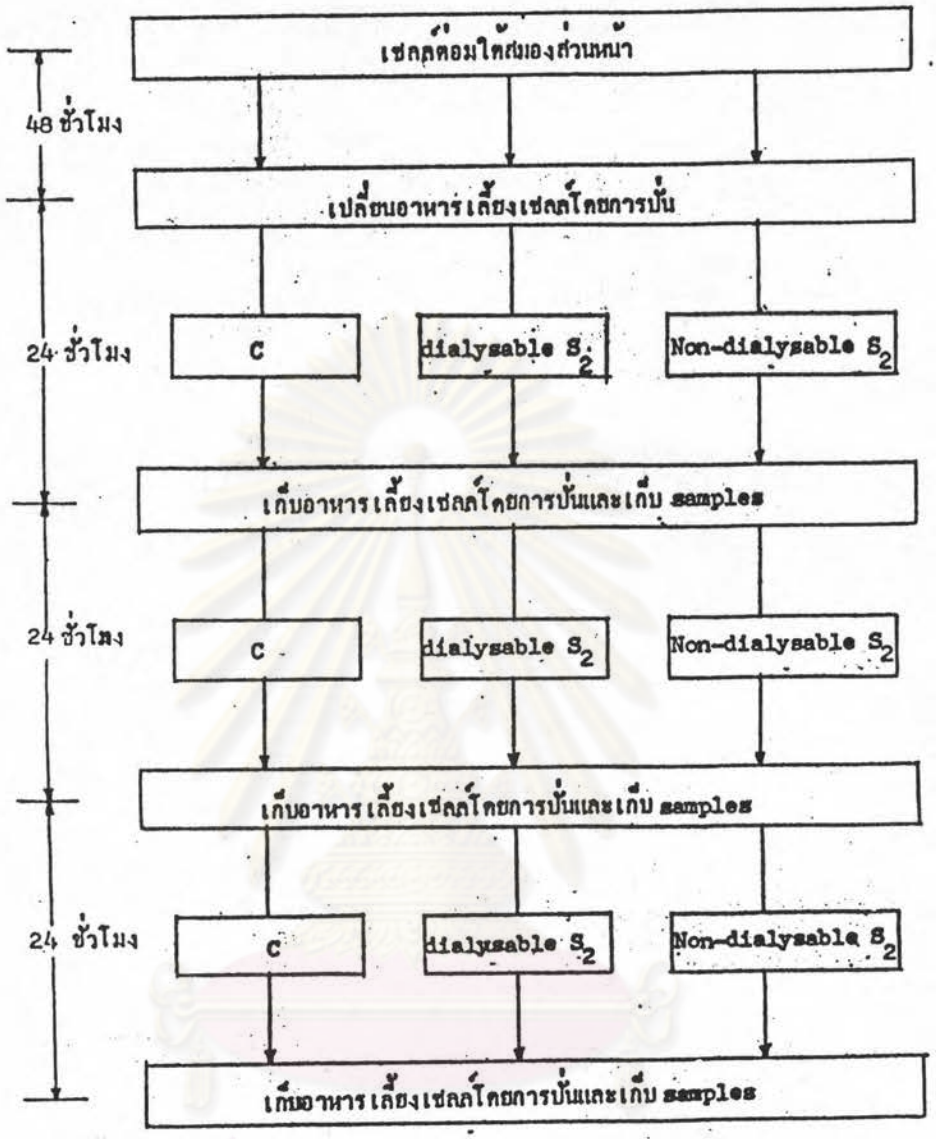
สำหรับวิธีที่ใช้ในการติดสลากอาศัยวิธีการของ Hunter และ Greenwood (1962) และ Greenwood , Hunter และ Glover (1963) ดังมีขั้นตอนต่อไปนี้

1. เตรียมเซฟาเดกซ์คอลัมน์ขนาด 0.9 x 30 ซ.ม. โดยแช่เซฟาเดกซ์ -G-25 ประมาณ 5 กรัมใน 0.05 M. EDTA-PB ประมาณ 100 มล. ค้างคืน นำมาดูดอากาศออกให้หมดแล้วจึงบรรจุเซฟาเดกซ์ลงในคอลัมน์ที่สะอาดจนได้ความสูงตามต้องการ อย่าให้มีฟองอากาศ ล้างคอลัมน์ด้วย 0.05 M. EDTA-PBS ประมาณ 100 มล. และตามด้วย 0.05 M. PBS-Gel pH 7



รูปที่ 4 การทดลองที่ 3 แผนผังแสดงการเติม GnRH 10^{-9} M. และเซรั่มลิงแสม 6% ที่ระยะต่างๆในการเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวเพศผู้อายุ 23–25 วัน

C = กลุ่มควบคุม



รูปที่ 5 การทดลองที่ 4 แผนผังการทดลองการเติมส่วนไดอะไลเสทและนอน-ไดอะไลเซเบิล ของเซรั่มลิงแสมเพศผู้ระยะ S_2 ต่อเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวอายุ 23-25 วัน

C = กลุ่มควบคุม

2. เติมสารเคมีตามลำดับขั้นตอนต่อไปนี้ด้วย hamilton syringe ขนาด 100 ul ลงใน reaction vial

สารเคมี	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (ต่อ 100 µl)	ปริมาณที่ใช้ (µl)
NIADDK-rat-FSH-I-6	0.5 M. PB pH 7.5	10 µg	50
$Na^{125}I$	0.001 N. NaOH	10 mCi	10
เขย่าเบาๆด้วยมือ			
คลอรามีน-ที	0.05 M. PB pH 7.5	200 µg	20
เขย่าให้เข้ากันดีและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 1 นาที 30 วินาที			
โซเดียมเมต้าไบซัลไฟท์	0.05 M. PB pH 7.5	200 µg	30
ซูโครส/โปตัสเซี่ยมไอโอไดด์	0.05 M. PB pH 7.5	16/1 µg	100
นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในคอลัมน์เซฟาเดกซ์-G-25 ที่เตรียมไว้แล้ว			

3. ล้าง reaction vial ด้วย 8% ซูโครสใน PBS-Gel ที่มีโปตสเซี่ยมไอโอไดด์ 0.1%จำนวน 20 มล. เก็บ fraction ทั้งหมด 36 fraction (12 หยด/0.5 มล./4 นาที)

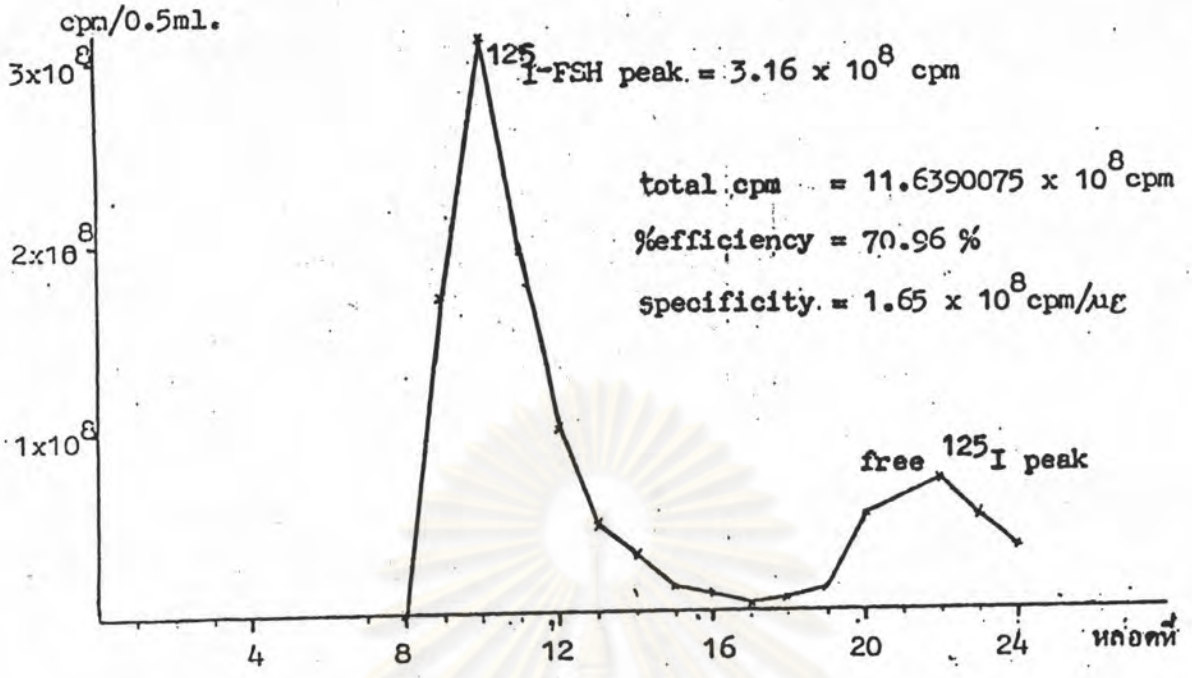
4. นำตัวอย่างจากแต่ละ fraction ปริมาณ 5 µl ไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง gamma counter แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างปริมาณรังสีกับลำดับของ fraction

5. peak แรกจะเป็นฮอร์โมนที่ติดสลากด้วย ^{125}I ซึ่งนำมาใช้เป็น tracer ดังรูปที่ 6

การตรวจหาฮอร์โมน FSH ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเส (RIA)

1. การเตรียมเครื่องมือและสารละลาย

1.1 บัฟเฟอร์สำหรับ 1°antibody (1° Ab) ใช้ EDTA-PBS-Gel 0.05 M. pH 7.0 100 มล.ผสมกับ normal rabbit serum (NRS) 250 µl เป็นอัตราส่วน 1 : 400



รูปที่ 6 กราฟของการติดสลากฮอร์โมน FSH ด้วย ^{125}I จากค่า cpm ในจำนวน fraction 0.5 มล. พบว่า ^{125}I-FSH อยู่ใน fraction ที่ 10

1.2 บัฟเฟอร์ standard หรือบัฟเฟอร์ของ sample ใช้ EDTA-PBS-Gel pH 7.0

1.3 บัฟเฟอร์สำหรับ tracer ใช้ Gel-PBS 0.05 M. pH 7.0 100 มล. ผสมกับ NRS 250 ul เป็นอัตราส่วน 1 : 400

1.4 บัฟเฟอร์สำหรับ second antibody (2° Ab) ใช้ EDTA-PBS

1.5 สารละลาย 1° Ab ใช้ NIADDK-anti-rFSH-S-11 (AFP-CO 972881) เตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ 1° Ab เท่ากับ 1 : 125,000

1.6 สารละลาย tracer ใช้ NIADDK-rFSH-I-6 (AFP-6697-B) ที่ติดสลากด้วย ^{125}I แล้วละลายด้วยบัฟเฟอร์ของ tracer (ข้อ 1.3) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30,000 cpm /100 ul

1.7 สารละลาย 2° Ab ใช้ donkey anti-rabbit serum เตรียมในบัฟเฟอร์ของ 2° Ab (ข้อ 1.4) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 : 20

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ขั้นตอนการทำเรดิโออิมมูโนเอสเส

2.1 เตรียมหลอดทดลองดังนี้ (ทุกตัวอย่างทำซ้ำอย่างละ 2 หลอดเสมอ)

หลอดที่ 1, 2 เป็น total count (TC)

total count เป็นตัวอย่างปริมาณรังสี (cpm)ของสารละลาย tracer 100 ul

หลอดที่ 3,4 เป็น non-specific binding (NSB)

หลอดที่ 5,6 เป็นเปอร์เซนต์ของ maximum binding (B_0)

หลอดที่ 7-22 เป็น standard เตรียม 7 dilution จากความเข้มข้น 50-0.78 นก./หลอด

หลอดที่ 23-40 เป็น quality control (QC) ใช้เซรั่มของหนูที่ตัดรังไข่ (แทน high dose) เซรั่มหนูเพศผู้(แทน low dose) เพื่อตรวจสอบ cross reaction กับเซรั่มลิงแสมโดยใช้เซรั่มลิงแสมเพศผู้และเพศเมีย หลอดละ 10 และ 20 ul ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 100 และ 200 ul เพื่อตรวจสอบการรบกวนของ phenol red แล้วเติมบัฟเฟอร์ของตัวอย่างให้ครบ 200 ul ทุกหลอด

หลอดที่ 41 เป็นต้นไป เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการตรวจหาฮอร์โมน FSH

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน ละลาย standard NIADDK-rFSH-RP-2 ทำ serial dilution โดยเริ่มความเข้มข้นจาก 50 นก.ถึง 0.78 นก.ใน 200 ul

2.3 คำนินการตามตารางที่ 1

การคำนวณค่าฮอร์โมน computer program ของเครื่องแกมม่า เคาน์เตอร์ คำนวณจากเครื่อง Facit 4200 ตามระหัส No. A 14 ให้กราฟมาตร ฐานตามรูปที่ 7 และจากทุก sample มีหน่วยเป็น นก./sample ซึ่งค่าเหล่านี้ทุกค่าต้องนำมาหักค่ารบกวนของ phenol red ในอาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 3.53%

ตารางที่ 4 วิธีทำ เรดิโออิมมูโนเอสเส (RIA) ของฮอร์โมน FSH

	วันที่ 1					วันที่ 2		วันที่ 3
	SAMPLE OR STD	SAMPLE BUFFER	TRACER	1° Ab (1.5)	เขย่าให้เข้ากันลั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง	2° Ab (1.7)	เขย่าให้เข้ากันเก็บ ที่อุณหภูมิ 4°ซ. 24 ชั่วโมง	หยุดปฏิกิริยาการทดลองโดยเติมหลอด TC ดำเนินการดังนี้ -เติมน้ำกลั่น อุณหภูมิ 4°ซ. 3 มล. -ปั่นในrefrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4°ซ. 3200 r.p.m. 45 นาที -เทสารละลายทิ้ง** -ตั้งทำหยดไว้บนกระดาษซับจนแห้ง -นำไปวัดสารกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่องแกมมาเคาน์เตอร์
	ไมโครลิตร	ไมโครลิตร	ไมโครลิตร	ไมโครลิตร		ไมโครลิตร		
TC	-	-	100	-		-		
NSB	-	200	100	100*		100		
B_o	-	200	100	100		100		
STD	200	-	100	100		100		
ตัวอย่าง	200	-	100	100		100		

TC = TOTAL COUNT

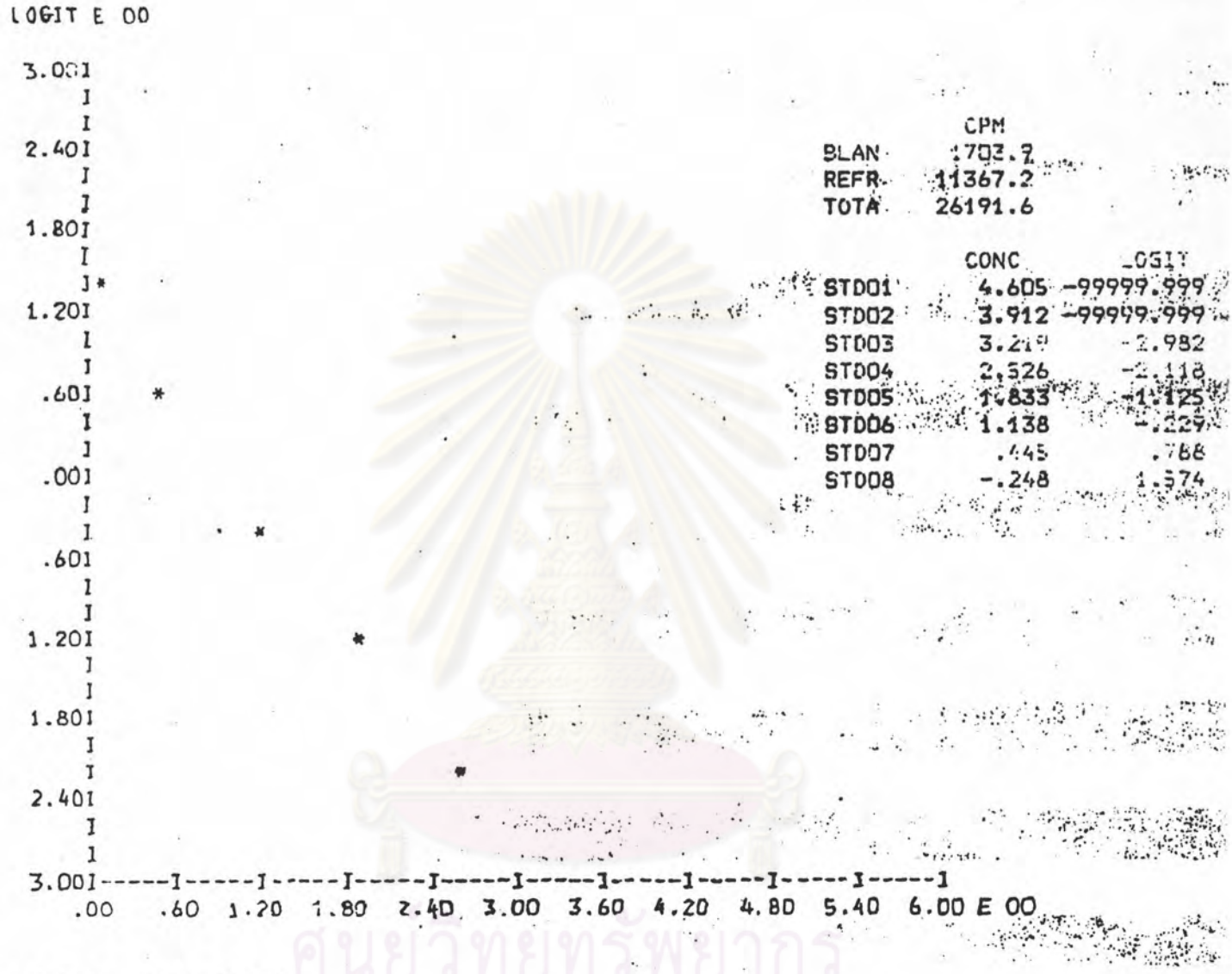
NSB = NON-SPECIFIC BINDING

B_o = MAXIMUM BINDING

STD = STANDARD

* ใช้บัฟเฟอร์สำหรับ Ab แทน 1° Ab

** อย่าให้สะเทือน ส่วนที่ตกตะกอน ซึ่งจะทิ้งไปบ้างไม่แน่นมากนัก



OC DATA (100%=REFR)

B/T .0651 R/T .4340

	CPM	CONC
.00	11367.2	1.000
.80	9093.8	.920
.50	5683.6	2.668
.20	2273.4	7.502

รูปที่ 7 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของการหาฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี RIA จาก program ของคอมพิวเตอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาฮอร์โมน FSH ด้วยวิธีไบโอเอสเสย์

1. การติดสลากไฟบริโนเจนด้วย ^{125}I

วิธีที่ใช้ในการติดสลากไฟบริโนเจนด้วย ^{125}I โดยการใช้ $Na^{125}I$ และคลอรามีน-ทีเป็นตัวออกซิไดส์นี้ใช้หลักของ Hunter และ Greenwood (1961) ดัดแปลงโดย Krohn et al.(1972, 1974) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเดกซ์ -G-25 เหมือนกับการเตรียมคอลัมน์ในวิธีติดสลากฮอร์โมน FSH

1.2 ดำเนินการเติมสารเคมีตามลำดับขั้นตอนต่อไปนี้ด้วย Hamilton syring ขนาด 100 ul ลงใน reaction vial

สารเคมี	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (ต่อ 1 มล.)	ปริมาณที่ใช้ (µl)
ไฟบริโนเจน	0.5 M. PB pH 7.5	4 มก.	50
$Na^{125}I$	0.001N. NaOH	100 mCi	10
เขย่าเบาๆด้วยมือ			
คลอรามีน-ที	0.05 M. PB pH 7.5	1.35 มก.	15
เขย่าให้เข้ากันดีและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 1 นาที			
โซเดียมเมต้าไบซัลไฟท์	0.05 M.PB pH 7.5	2 มก.	30
เขย่าให้เข้ากัน			
ซูโครส/โปตัสเซี่ยมไอโอไดด์	0.05M. PB pH 7.5	0.16 มก./0.01 มก.	100

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในคอลัมน์เซฟาเดกซ์-G-25 ที่เตรียมไว้แล้ว

1.3 ดำเนินการตามข้อ 3-5 ของการติดสลากฮอร์โมน FSH ด้วย ^{125}I วิธีติดสลากไฟบริโนเจนด้วย ^{125}I นี้จะมี specific radioactivity ของไฟบริโนเจน 1 ug ประมาณ 300,000 cpm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเคลือบไฟบริโนเจนที่ติดสลากด้วย ^{125}I ลงในถาดหลุมพลาสติคสำหรับเลี้ยงเซลล์

2.1 การเตรียมสารละลายก่อนการเคลือบ

2.1.1 การเตรียมฟอสเฟตบัปเฟอร์ เซไลน์ (PBS)

ซ้งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 4000 มก. กรดไฮโดรคลอริค (HCl) 100 มล. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 575 มก.และโปตัสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 100 มก. แล้วเติมน้ำกลั่นครบ 500 มล.

2.1.2 เตรียมไฟบริโนเจนที่ไม่ได้ติดสลาก ความเข้มข้น 10 มก./มล. ใช้ไฟบริโนเจน 100 มก.ละลายใน PBS (จากข้อ 2.1.1) 10 มล.ผสมให้เข้ากัน

2.2 วิธีเคลือบถาดหลุมเลี้ยงเซลล์

2.2.1 นำสารละลายไฟบริโนเจนที่ไม่ได้ติดสลาก (ข้อ 2.1.2)ละลายในส่วนผสมของPBS (ข้อ 2.1.1) 1 ส่วนกับน้ำกลั่น 11 ส่วนให้มีความเข้มข้น 0.12 มก./มล.

2.2.2 นำไฟบริโนเจนที่ติดสลากด้วย ^{125}I ผสมกับสารละลายตามข้อ 2.2.1 ให้มีสารกัมมันตภาพรังสีประมาณ 400,000 cpm /มล.

2.2.3 ใช้สารละลายตามข้อ 2.2.2 ปริมาณ 0.25 มล.ใส่แต่ละหลุม ซึ่งจะมีสารกัมมันตภาพรังสีประมาณ 100,000 cpm /หลุม

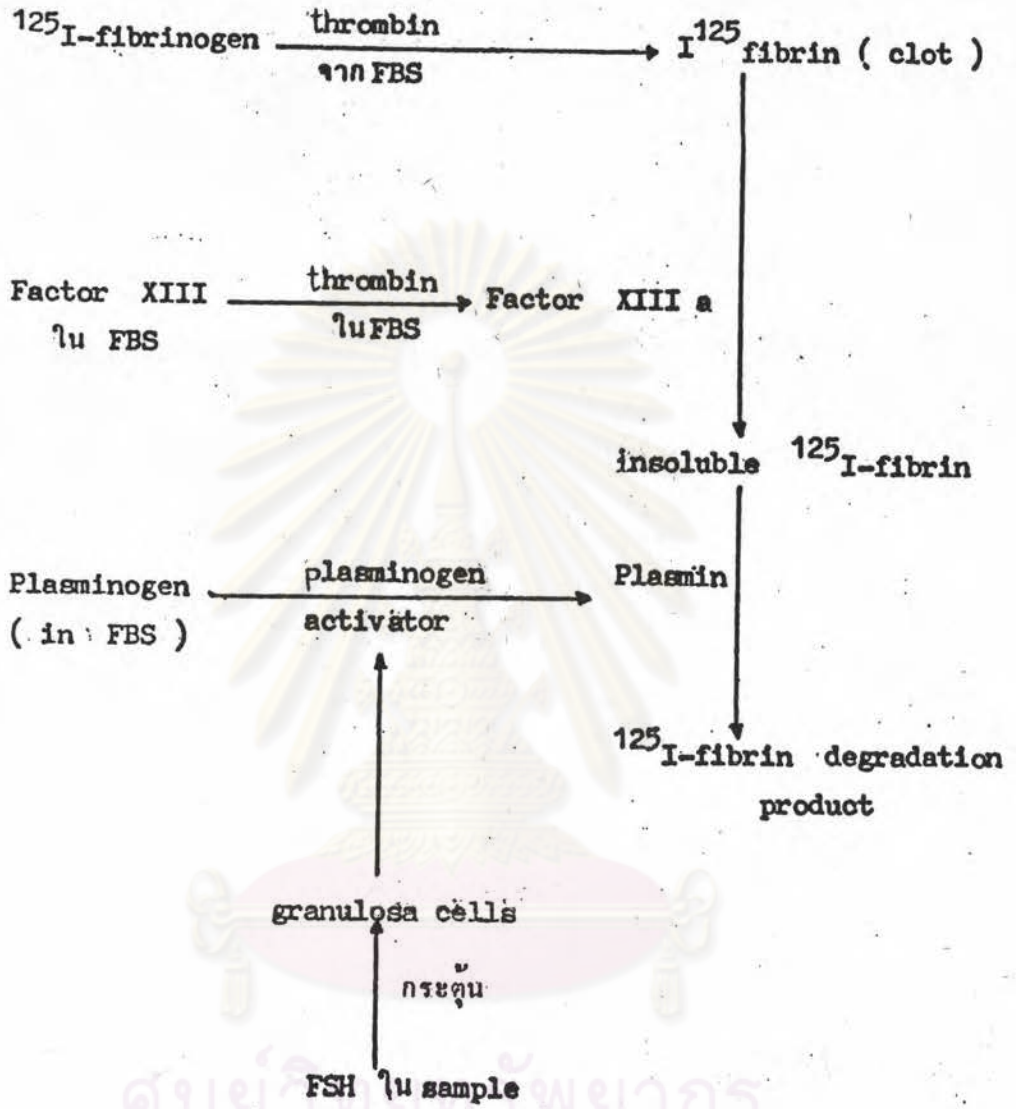
2.2.4 ปล่อยให้แห้งที่ 37°ซ. 3 วันในตู้อบโดยเผยอฝาถาดเล็กน้อย

2.2.5 เมื่อถาดหลุมเลี้ยงเซลล์แห้งหลัง 3 วันแล้ว ปิดฝาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะถึงเวลาเอสเสย์

3. การหาปริมาณฮอร์โมน FSH โดยวิธีไบโอเอสเส

โดยวิธีของ Beers และ Strickland (1978)ซึ่งใช้หลักที่ว่า granulosa cells ของหนูจะสร้างโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า plasminogen activator ตอบสนองตามปริมาณของฮอร์โมน FSH และ plasminogen activator ที่ได้นี้จะไปเปลี่ยนโปรตีนในเซรั่ม คือ plasminogen ให้เป็น plasmin ซึ่งจะไปละลาย ^{125}I-fibrin ซึ่งได้มาจากการที่ thrombin ใน M 199 + 10% depleted plasminogen FBS เปลี่ยน ^{125}I-fibrinogen

ให้เป็น ^{125}I-fibrin)ที่เคลือบไว้ในหลุมหลุดออกจากส่วนที่เคลือบลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถดูดออกไปวัดสารกัมมันตภาพรังสีได้ต่อไป ขั้นตอนของปฏิกิริยามีตามไดอะแกรมต่อไปนี้



วิธีทำ

1. ในการตรวจหาฮอร์โมนFSH โดยวิธีไบโอเอสเสนี้ใช้ 2 หลุม/1 sample เหมือนกันหมด

2. ใช้หนูขาวเพศเมียอายุ 26 วันฉีดPMSG 5 IU เข้าทางใต้ผิวหนัง

3. หลังจาก 48 ช.ม.แล้วฆ่าหนูโดยวิธี decapitation แล้วตัดรังไข่อย่างรวดเร็วใส่ใน M 199 ด้วยวิธีปลอดเชื้อ

4. แยกเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่รังไข่ออกให้หมดภายใต้ microscopic dissection

5. นำรังไข่ที่แยกสะอาดแล้วล้างด้วย M 199 ที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง

6. ภายใต้กล้องจุลทัศน์ ด้วยเข็มเบอร์ 26 G เจาะผนังของฟอลลิเคิลและกระแทกด้วยการอัดอากาศเบาๆให้แตกออก **granulosa cells** จะหลุดออกมา

7. นำ **granulosa cells** ในสารละลาย M 199 มาปั่นที่ 1500 **rpm** 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25°ซ.

8. ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งและนำ M 199 + 10% **plasminogen depleted FBS** ใส่ลงใหม่ 5 มล. ผสมให้เซลล์กระจายทั่วกันดีแล้วจึงนับเซลล์โดยฮีมาไซโตมิเตอร์

9. แบ่ง **granulosa cells** ใส่ในถาดพลาสติคเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุมที่เคลือบไฟบริโนเจนที่ติดสลากด้วย ^{125}I ที่แห้งเรียบร้อยแล้ว จำนวน 50,000 เซลล์/0.5 มล./หลุม

10. ดำเนินการตามตารางที่ 2

11. ในการใส่ฮอร์โมน FSH เพื่อทดสอบ ดำเนินการดังนี้

หลุมที่ 1-2 ไม่ใส่ฮอร์โมน เป็น **total solubilized**

หลุมที่ 3-4 ไม่ใส่ฮอร์โมน เป็นกลุ่มควบคุม เป็นการวัดการหลุดออกของสารกัมมันตภาพรังสีที่มิได้เป็นผลมาจากฮอร์โมน FSH

หลุมที่ 5-22 ใส่ฮอร์โมน **standard** NIADDK-rFSH-RP-2 ที่ความเข้มข้นต่างๆกันโดยทำ **serial dilution** โดยมีความเข้มข้นจาก 50 ถึง 0.195 นก. ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ M 199 + 10 % **plasminogen depleted FBS** 200 **ul**

หลุมที่ 22-42 เป็น QC ใช้เซรั่มหนูที่ตัดรังไข่ออกแล้ว เซรั่มหนูเพศผู้ เซรั่มลิงแสมเพศผู้ เซรั่มลิงแสมเพศเมีย เป็น QC ระหว่าง **inter-assay** ใช้หลุมละ 50 **ul** และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ M 199 + 10 % **plasminogen depleted FBS** ครบ 200 **ul**

หลุมที่ 43 เป็นต้นไป เป็นตัวอย่างที่จะหาปริมาณฮอร์โมน FSH ใช้หลุมละ 200 **ul**

I15721565.

ตารางที่ 2 แผนผังการหาปริมาณฮอร์โมน FSH โดยวิธีไบโอเอสเส (ใช้หลักของ Beer's และ Strickland), (1978)

วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 4												วันที่ 5
- เลือยถาดเลี้ยงเซลล์พลาสติกด้วยไฟบริโนเจนที่ดัดสลากด้วย ^{125}I ให้มีกัมมันตภาพรังสีประมาณ 100,000 CPM /หลุม - นำไปอบที่ 37° ซ. 72 ชั่วโมง โดยเผยอฝาเล็กน้อย	- ฉีด PMSG 5 IU. เข้าหางใต้ผิวหนังหนูเพศเมีย อายุ 26 วัน 48 ชั่วโมง	- ถาดเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยไฟบริโนเจนที่ดัดสลากด้วย ^{125}I แห้งปิดฝา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง - แยก Granulosa cells ให้เป็นเซลล์เดี่ยวและดำเนินการดังนี้										- ครบ 12 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดไปวัดปริมาณของกัมมันตภาพรังสี ที่หลุดออกมาโดยเครื่องแกมมาเคาน์เตอร์
			จำนวน granulosa cells	M.199 + 10% plasminogen depleted FBS(ul)	ชุบเลี้ยงที่ 37° ซ. ในอากาศผสมด้วย 5% CO_2 ที่มีไอน้ำอิ่มตัว 3 ช.ม.	เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มี ^{125}I-ไฟบริโนเจน จะเปลี่ยนเป็น ^{125}I-fibrin	std. หรือตัวยาที่จะทดสอบ (ul)	M.199+10% plasminogen depleted FBS (ul)	ชุบเลี้ยงที่ 37° ซ. ในอากาศผสมด้วย 5% CO_2 ที่มีไอน้ำอิ่มตัว 3 ช.ม.	เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ และลาง 2 หมวด M.199 ที่ไม่มี FBS	M.199+10% Acid treated FBS (ul)	0.25% trypsin (ul)	ชุบเลี้ยงที่ 37° ซ. ในอากาศผสมด้วย 5% CO_2 ที่มีไอน้ำอิ่มตัว 3 ช.ม.	
		Total Solubilized	-	500			-	500			-	500		
		กลุ่มตัวอย่าง	50,000	500			200	300			500	-		
		Standard	50,000	500			200	300			500	-		
		ตัวอย่างที่จะทดสอบ	50,000	500			200	300			500	-		

การทำกราฟมาตรฐาน

หาค่า % substrate solubilized ของ standard แต่ละค่าจากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ substrate solubilized} = \frac{\text{cpm ที่อ่านได้} - \text{cpm กลุ่มควบคุม}}{\text{cpm ของ total solubilized}} \times 100$$

และนำค่า % substrate solubilized ของ standard แต่ละค่ามา plot กราฟมาตรฐานกับความเข้มข้น จากการทดลองนี้เราทำกราฟมาตรฐานในการทดลอง 4 ครั้ง ดังนั้นกราฟมาตรฐานเฉลี่ยในการทดลองครั้งนี้ ดังรูปที่ 8

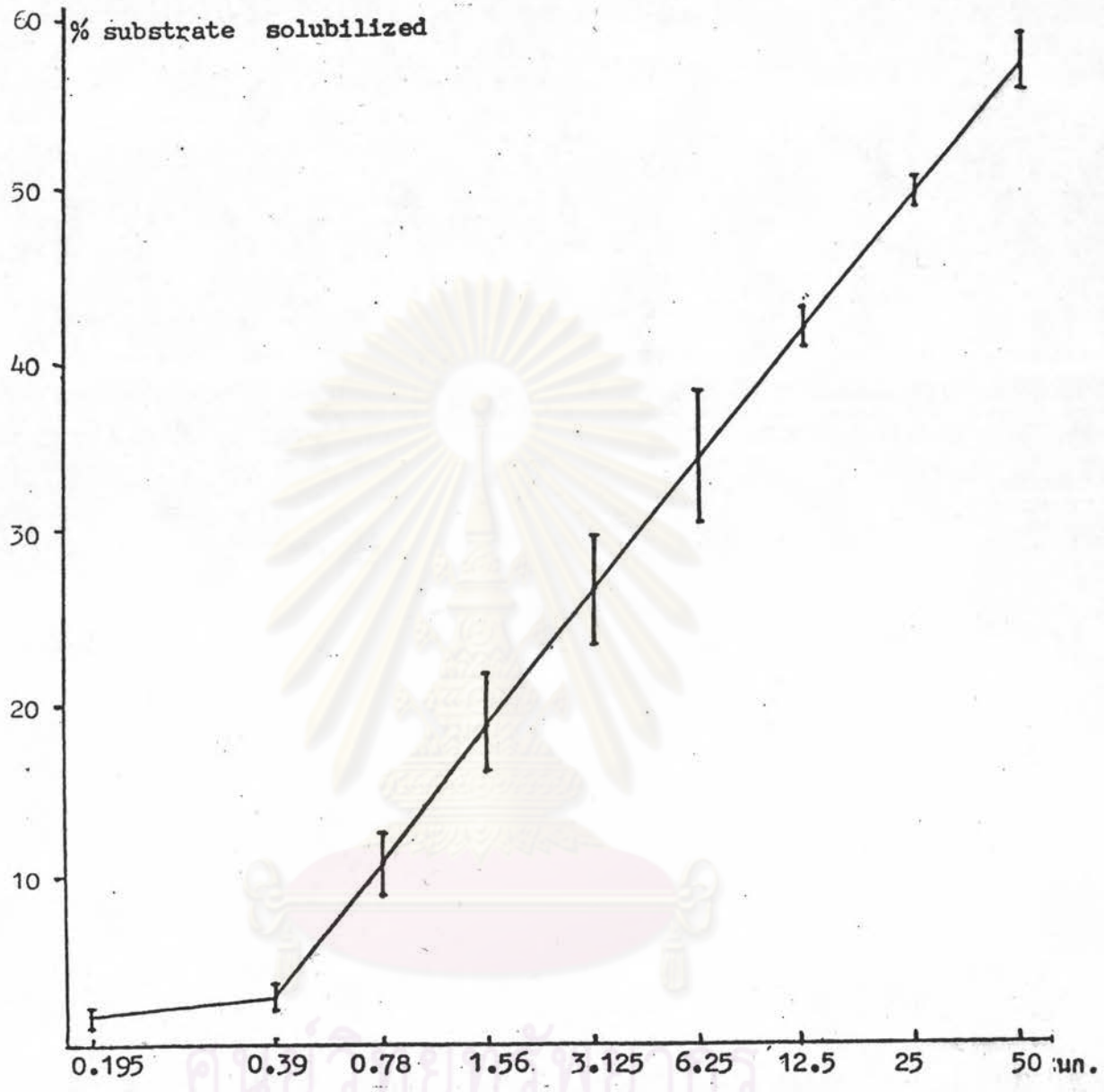
การคำนวณค่าตัวอย่าง

นำค่ากัมมันตภาพรังสีที่ได้มาหาค่า % substrate solubilized เช่นเดียวกับการคำนวณในการหาค่า standard นำทั้ง 2 ค่ามาเฉลี่ยและนำไปอ่านเป็นความเข้มข้นของฮอร์โมน FSH จากกราฟมาตรฐาน หน่วยเป็น นก./0.2 มล.

การแปลผลทางสถิติ

ใช้วิธี ANOVA และ Duncan's multiple range test ตามความเหมาะสมของการทดลองและใช้ paired t-test ในการแปลผลอัตราส่วน FSH ของฮอร์โมน FSH ระหว่างการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละครั้งว่าจะแตกต่างกันหรือไม่ โดยใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ยอมรับ คือ สูงกว่า 95% หรือ $P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



หมายเหตุ n =4 หมายถึง จากการทดลองต่างๆกัน 4 การทดลอง

รูปที่ 8 ค่าเฉลี่ยของกราฟมาตรฐานของ BA-FSH ค่าที่ได้ของแต่ละจุดเป็น $\bar{x} \pm$ SEM (n = 4)