วัสดุและวิธีทำการวิจัย

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีที่ใช้เตรียม assay buffer

Tris (hydroxymethyl) methylamine	Analar	BDH
Ethylenediamine tetraacetic acid (disodium salt)	Laboratory reagent	BDH
Sodium azide	Laboratory reagent	BDH

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน

Sodium tungstate	Analar	BDH
Sodium molybdate	Analar	BDH
Sodium carbonate	Analar	BDH
Sodium hydroxide	Analar	BDH
Potassium tartrate	Analar	BDH
Cupric sulfate anhydrous	Laboratory reagent	BDH
Lithium sulfate	Laboratory reagent	BDH
Hydrochloric acid	Laboratory reagent	BDH
Phosphoric acid	-	Merck
Bovine serum albumin (BSA) crystallized, lyophilized (Sig		

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิค (DNA)

Sodium chloride	Analar	BDH
Chloroform	Analar	BDH
Glacial acetic acid	Analar	BDH
Concentrate sulfuric acid	Analar	BDH

Calf thymus DNA sodium salt	-	BDH
Acetaldehyde	Laboratory reagent	BDH
Diphenylamine	Laboratory reagent	BDH
Perchloric acid 70 %	-	Merck

1.4 สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายผงถ่าน

Gelatin bacto (Difco certified) Difco laboratory Michigan

Dextran T 70 Pharmacia Fine Chemical Uppsala, Sweden

Activated charcoal (Norit A) Matheson Coleman & Bell Co.,

1.5 สารรังสีและสารเคมีที่ใช้ละลายและทดสอบความบริสุทธิ์ของสารรังสี

(2,4,6,7 **N** - ^{3}H) Estradiol, 85 ci/mM ความเข้มข้น 1 mci/ml, Radiochemical center, Amersham, England.

Sephadex LH 20 Pharmacia Fine Chemical Uppsala Sweden

Benzene	Analar	BDH
Ethanol	Analar	BDH

1.6 สารเคมีที่ใช้เตรียม scintillation fluid

Toluene	Baker analysed	Baker

1,4 - Bis - (5 - phenyl - 2 - oxazolyl) - benzol for scintillation, Fluka AG ; Buchs SG; Switzerland

2,5 - Diphenyl - oxazole for scintillation, Fluka AG; Buchs SG; Switzerland

1.7 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณอีสโตรเจนในน้ำเหลือง

Ethyl acetate	Baker intraanalysis	Baker
Ethylene glycol	Chromato quality	Coleman & Bell Co.
Celite	Analytical Filter Aid	John Manvill
Ether	Analar	Hallinekrodt

Sodium phosphate dibasic Heptahydrate	Analar	Mallinckrodt
Sodium phosphate monobasic monohydrate	Analar	Mallinckrodt
2,2,4 - Trimethyl pentane (Isooctane)	Nanograde	Mallinckrodt

Anti - E_2 - 17 β - monohemisuccinate - human serum albumin from Ass. Prof. Guy E. Abraham, Department of Obs. & Gyn. University of California.

17 β - Estradiol (1,3,5(10)) estratrien - 3, 17, β - diol ได้รับความเอื้อเฟื้อจากสถาบันเวชศาสตร์ประชากร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2. <u>เครื่องมือ</u>

2.1 I.E.C. Refrigerated Centrifuge, model PR - 2, International Equipment Co.,

2.2 Packard Tri - Carb Liquid Scintillation Spectrometer, model 3390, Packard instrument Co.,

2.3 pH meter, model 39, Coleman Instrument Co.,

2.4 Shaking Water bath, Lab - Line Instrument Co.,

2.5 Super - mixer, Lab - Line Instrument Co.,

2.6 Magnetic stirrer, Lab - Line Instrument Co.,

2.7 Variable Speed Laboratory Motor with homogenizer, model 863, Tri - R Instument Co.,

2.8 Spectrophotometer, Junior 2, model 6/35, Coleman Instrument Co.,

3. ตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมที่ทำการวิจัย

3.1 เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม (carcinoma breast tissue)

เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมได้จากคนไข้หญิงที่มารับการรักษาโดยการผ่าตัดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, ศิริราช และรามาธิบดี จำนวน 85 ตัวอย่าง ก้อนเนื้อมะเร็งเต้านมเป็นชนิดปฐมภูมิ (primary) จากคนไข้อายุต่าง ๆ กัน มีทั้งการแพร่กระจายและไม่มีการแพร่กระจายของเซลมะเร็งไปตามต่อมน้ำเหลือง

3.2 เนื้องอกเต้านมธรรมดา (benign breast tissue)

เนื้องอกเต้านมธรรมดาได้จากคนไข้หญิงที่มารับการรักษาโดยการผ่าตัดที่โรงพยาบาลศิริราช จำนวน 15 ตัวอย่าง

3.3 เนื้องอกเต้านมชนิด gynaecomastia

เนื้องอกเต้านมชนิดนี้ได้จากคนไข้ชายที่มารับการรักษาโดยการผ่าตัดที่โรงพยาบาลศิริราช จำนวน 5 ตัวอย่าง

3.4 เนื้อเยื่อเต้านมปกติ (normal breast tissue)

เนื้อเยื่อเต้านมปกติได้จากหญิงที่เสียชีวิตโดยอุบัติเหตุ จากโรงพยาบาลตำรวจ จำนวน 5 ตัวอย่าง

วิธีการทดลอง

1. การเก็บสารตัวอย่างและน้ำเหลือง

1.1 การเก็บเนื้อเยื่อเต้านม

ก้อนเนื้อที่เต้านมทั้งชนิดธรรมดา gynaecomastia และชนิดที่เป็นมะเร็งจากห้องผ่าตัดโดยการผ่าตัดเต้านม (mastectomy) หรือ biopsy รวมทั้งเนื้อเยื่อเต้านมปกติจากการชันสูตรศพ น้ำหนักประมาณ 0.2 – 2.0 กรัม นำมาใช้ในการวิจัยนี้ภายในครึ่งชั่วโมงหลังผ่าตัดหรือชันสูตรโดยการล้างใน cold normal saline แล้วแช่แข็งทันทีที่ – 70 องศาเซลเซียส ในภาชนะที่บรรจุใน

น้ำแช่งแห้ง สภาวะทางพยาธิของเนื้องอกแต่ละตัวอย่างได้รับการวิเคราะห์จากห้องทดลองทางพยาธิของโรงพยาบาล

1.2 การเก็บน้ำเหลือง

เจาะเลือกจากอาสาสมัครหญิง 4 คน จากโรงพยาบาลเลิดสิน คนไข้ที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมจำนวน 11 คน ซึ่งมีอายุมากกว่า 50 ปี และไม่มีประจำเดือน โดยนัดเจาะเลือดในรายที่เป็นอาสาสมัคร และเจาะเลือดก่อนการผ่าตัดในรายที่เป็นคนไข้ ตั้งเลือดที่เจาะไว้ในอุณหภูมิห้อง เพื่อให้เม็ดเลือดแยกตัวจากน้ำเหลือง บั่นแยกเอาน้ำเหลือง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

2. <u>การเตรียมสารละลายต่าง ๆ</u>

2.1 สารละลายที่ใช้ เป็น assay buffer

Tris - (hydroxymethyl) methylamine	1.2184	กรัม
Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt	0.1861	กรัม
Sodium azide	0.2460	กรัม

เติมน้ำกลั่น คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วยสารละลายกรดเกลือ หรือสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนได้ pH 7.5 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เติม gelatin 1 กรัม อุ่นจน gelatin ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส สารละลายที่ได้เรียกว่า assay buffer

2.2 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 gm %

Charcoal (Norit A)	0.25	กรัม
Dextran T 70	0.0025	กรัม
Assay buffer	100	มล.

คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้ทุกครั้งต้องนำมาคนใหม่อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.3 สารละลายที่ใช้หาปริมาณโปรตีน

2.3.1 การเตรียม phenol reagent (Folin & ciocalteu)

Sodium tungstate	50	กรัม
Sodium molybdate	12.5	กรัม
น้ำกลั่น	350	มล.
85 % phosphoric acid	25	มล.
กรดเกลือเข้มข้น	50	มล.

Reflux ด้วยไฟอ่อน ๆ 2 ชั่วโมง เติม Lithium sulfate 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มล. น้ำโบรมีน 2 – 3 หยด ต้มสารละลายนี้ประมาณ 15 นาที เพื่อไล่โบรมีนที่มากเกินพอออก ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มล. เรียกสารละลายที่เตรียมได้นี้ว่า phenol reagent ทุกครั้งที่จะใช้ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1.2 เท่า เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 N.

(Dawson และคณะ, 1969 ; Hawk และคณะ, ,1965)

2.3.2 การเตรียม alkaline copper solution

Solution A ละลาย sodium carbonate 20 กรัม ใน 0.1 N sodium hydroxide

Solution B ละลาย cupric sulfate 0.5 กรัม ใน น้ำกลั่น 50 มล.

Solution C ละลาย potassium tartrate 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มล.

เมื่อจะใช้ทุกครั้ง ปิเปต solution B และ solution C อย่างละ 1 มล. ลงใน solution A 100 มล. คนให้เข้ากัน เรียกสารละลายผสมนี้ว่า alkaline copper solution

2.3.3 การเตรียม standard BSA เข้มข้น 1 มก./มล.

BSA	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่ – 20 องศาเซลเซียส

2.4 สารละลายที่ใช้หาปริมาณ DNA

2.4.1 Diphenylamine reagent

Diphenylamine	2.0	กรัม
Distilled acetic acid	100	มล.

คนให้สารละลายเข้ากัน เรียก Diphenylamine reagent **(DPA)**

2.4.2 การเตรียม **aqueous acetaldehyde reagent**

acetaldehyde	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	10	มล.

คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน เรียกสารละลายที่ได้ว่า aqueous acetaldehyde เมื่อต้องการจะใช้ เติม aqueous acetaldehyde นี้ 1 มล. และกรดซัลฟูริคเข้มข้น 3 มล. ลงใน DPA reagent 200 มล. คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งการเตรียมนี้ใช้เฉพาะการทดลองในวันนั้นเท่านั้น

2.4.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน calf thymus DNA

Calf thymus DNA	0.1	กรัม
10 % perchloric acid	100	มล.

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.5 สารละลาย radioactive estradiol - **17 β (17 β** $^{3}H - E_2$)

2.5.1 การเตรียม 17-β $^{3}H - E_2$ 1000 นาโนกรัม (2,4,6,7 n - ^{3}H) estradiol ซึ่งมี specific activity 85 กิวรี่/มิลลิโมล ซึ่งเข้มข้น 1 มิลลิคิวรี่/มล. ปริมาณทั้งหมด 1 มล. ทำให้เจือจางด้วยสารละลาย Benzene : Ethanol (95 : 5) 2.2 มล. มีปริมาณ 17-β $^{3}H - E_2$ เท่ากับ 1000 นาโนกรัม เก็บไว้ที่ 4 – 10 องศาเซลเซียส

2.5.2 การเตรียม 17-β $^{3}H - E_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ปิเปต 17-β ^{3}H - E_2 ความเข้มข้น 1000 นาโนกรัม (ที่เตรียมได้ตามข้อ 2.5.1) มา 10 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วยกาซไนโตรเจน เติม assay buffer 2.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน ซึ่ง 0.1 มล. ของสารละลายนี้จะมี 17-β ^{3}H - E_2 400 พิโคกรัม ทำ serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 400, 200, 160, 80, 60, 40, 20, 10 พิโคกรัม หรือ 147.2, 73.6, 58.88, 36.8, 29.44, 22.08, 14.72, 7.36, 3.68 x 10^{-14} โมล ใน 0.1 มล. assay buffer ตามลำดับ สารละลายทั้งหมดเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.6 สารละลาย scintillation fluid

2.5 - Diphenyl - oxazole	10	กรัม
1,4 - Bis - (5 - phenyl-2-oxazolyl)-benzol	0.25	กรัม
toluene	2.5	ลิตร

ละลายให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

2.7 การเตรียมสารละลายที่ใช้หาปริมาณฮอร์โมนอีสโตรเจนในน้ำเหลือง

2.7.1 การเตรียมสารละลาย phosphate buffer pH 7.0

Sodium phosphate dibasic heptahydrate	32.7	กรัม
Sodium phosphate monobasic heptahydrate	10.8	กรัม
Sodium azide	2.0	กรัม
Sodium chloride	18.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปวัด pH ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลายกรดเกลือ หรือ สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำกลั่นอีกให้มีปริมาตรเป็น 2 ลิตร จากนั้น เติม gelatin 2 กรัม อุ่นจนละลาย เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.7.2 การเตรียมสารละลายผงถ่านความเข้มข้น 0.625 กรัม %

charcoal (Norit A)	0.625	กรัม
Dextran T 70	0.00625	"

phosphate buffer 100 มล.
คนให้เข้ากันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.7.3 สารละลาย radioactive - 17 β ^{3}H - E_2

(6, 7) - ^{3}H estradiol ความเข้มข้น 56 พิโคกรัม/มล ได้รับความเอื้อเฟื้อจากสถาบันเวชศาสตร์ประชากร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2.7.4 สารละลายแอนทิบอดี

Anti - E_2 - 17 β - monohemisuccinate ความเข้มข้น (1 : 100,000) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากสถาบันเวชศาสตร์ประชากร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้รับมาจาก Ass. Prof. Guy E. Abraham, Dept. of Obs. & Gyn: U. of California

2.7.5 สารละลายมาตรฐาน E_2

สารละลายมาตรฐาน E_2 ความเข้มข้น 100, 50, 20, 10, 5 พิโคกรัม/มล. ได้รับความเอื้อเฟื้อจากสถาบันเวชศาสตร์ประชากร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2.8 การเตรียม celite microcolumn

ชั่ง celite ซึ่งเผาในเตาเผา (1000 องศาฟาเรนไฮต์) 20 กรัม เติม ethylene glycol 10 มล. คนให้เข้ากัน บรรจุใน column (ใช้ disposable graduated glass pipette) อัด celite ให้แน่น โดยแต่ละ column มีปริมาณ celite ประมาณ 0.5 กรัม ล้าง celite column ด้วย isooctane 3 ครั้ง ๆ ละ 3.5 มล.

2.9 การเตรียม sephadex LH 20 column สำหรับทดสอบความบริสุทธิ์ของสารรังสี

ชั่ง sephadex LH 20 10 กรัม เติมสารละลาย Benzene : Ethanol (3 : 1) ทิ้งให้ sephadex LH 20 พองตัว ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงบรรจุใส่ใน column (1 3 ซม.) ล้าง column ที่เตรียมแล้วด้วย

สารละลาย Benzene : Ethanol (3 : 1) ประมาณ 20 มล.

3. <u>วิธีวัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนโดยการดูดซับด้วยผงถ่าน</u> (Feherty และคณะ, 1971 ; E.C.R.E.C., 1973)

3.1 การเตรียมไซโตซอล

นำก้อนเนื้องอก (ตามข้อ 1.1 หน้า 19) มาเลาะไขมันและเนื้อขาวที่อยู่รอบ ๆ ก้อนเนื้องอกทิ้ง ชั่ง และตัดก้อนเนื้องอกนั้นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วเติม assay buffer (ตาม ข้อ 21 หน้า 20) ประมาณ 5 ปริมาตร/นน. (v/w) จากนั้นจึง homogenize โดยเครื่อง tri - R Teflon homogenizer ที่ความเร็ว 1,750 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 วินาที โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง homogenate ที่ได้ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใส (supernate) ใน I.E.C. refrigerated centrifuge ที่ 1000 X g เป็นเวลา 20 นาที เรียกชั้นน้ำใสที่ได้ว่าไซโตซอล ส่วนที่ตกตะกอนคือ nuclear pellet เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อหา DNA การทดลองที่กล่าวมา ทำที่ 0 – 4 องศาเซลเซียส

3.2 การทดลองหาเวลาและอุณหภูมิในปฏิกริยาการจับตัวของ 17-β ^{3}H - E_2 กับรีเซพเตอร์โปรตีน (Feherty และคณะ, 1971)

นำ 0.1 มล.ของไซโตซอลที่เตรียมได้มาอินคิวเบทกับสารมาตรฐาน 17 β ^{3}H - E_2 ความเข้มข้น 40 พิโคกรัม/0.1 มล. assay buffer (หัวข้อ 2.5.2 หน้า 22) ที่อุณหภูมิ 4 ระดับ คือ 4 องศาเซลเซียส, 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส แต่ละระดับอุณหภูมิทดสอบเป็นเวลานาน 20 ชั่วโมง โดยทำที่ช่วงเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 360 และ 1,200 นาที เมื่อถึงช่วงเวลาดังกล่าว เติมผงถ่านที่เคลือบด้วย Dextran ความเข้มข้น 0.25 กรัม % (หัวข้อ 2.2 หน้า 20) ลงไป 0.5 มล. อินคิวเบทสารผสมดังกล่าวต่อไป

อีก 15 นาที ที่ 30 องศาเซลเซียส นำไปปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสที่ 1000 xg 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที นำชั้นน้ำใสมาเติม scintillation fluid 10 มล. วัดปริมาณกัมมันตรังสีในเครื่อง Packard scintillation counter

3.3 การทดลองหาความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 ที่ใช้ในการวัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน (Leclercq และคณะ, 1973)

อินคิวเบท 0.1 มล. ไซโตซอลกับสารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 ที่ปริมาณต่าง ๆ คือ 3.68, 7.36, 14.72, 22.08, 29.44, 36.8, 58.88, 73.6 และ 147.2x10^{-14} โมล/0.1 มล. assay buffer (หัวข้อ 2.5.1 และหัวข้อ 2.5.2 หน้า 22) ที่ 20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เติมผงถ่าน 0.25 กรัม% ปริมาณ 0.5 มล. อินคิวเบทสารผสมดังกล่าวต่อไปอีก 15 นาที ที่ 30 องศาเซลเซียส นำไปปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสที่ 1000 x g เติม scintillation fluid 10 มล. วัดปริมาณกัมมันตรังสี

3.4 การทดลองหาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมในการแยกพวก free form ออกจาก bound form

เตรียมผงถ่านซึ่งมีปริมาณ 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 และ 1.0 กรัม % ผสมลงใน assay buffer ซึ่งมีปริมาณ Dextran น้อยกว่าผงถ่าน 10 เท่า

ใช้สารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 ความเข้มข้น 400 พิโคกรัม/0.1 มล. assay buffer อินคิวเบทกับ 0.1 มล. ของสารละลายต่อไปนี้

ก. Blank ไม่ใช้ไซโตซอล ใช้ assay buffer แทน

ข. ไซโตซอลของเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม

ค. ไซโตซอลของเนื้องอกเต้านมธรรมดา

หลังอินคิวเบทที่ 20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วเติมผงถ่าน 0.25 กรัม % ลงในสารผสมดังกล่าว อินคิวเบทต่อที่ 30 องศาเซลเซียส 15 นาที ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี

3.5 การทดลองหาเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการขจัดพวก low affinity binding complex และ 17-β ^{3}H - E_2 โดยผงถ่าน (Mester และคณะ, 1970)

อินคิวเบทไซโตซอลกับสารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 (40 พิโคกรัม/ 0.1 มล. assay buffer ที่ 20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังกล่าว เติมผงถ่าน 0.25 กรัม % ปริมาณ 0.5 มล. อินคิวเบทต่อไปในช่วงเวลา 0, 2, 5, 10, 15, 30, 60 และ 120 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส, 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาแต่ละช่วง ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี

3.6 การทดลองหาอิทธิพลของความร้อนที่มีผลต่อ activity ของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน

แบ่งไซโตซอลเป็น 2 ชุด ชุดหนึ่งนำไปอุ่นที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 5, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ อีกชุดหนึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 – 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาเท่ากัน เมื่อครบเวลาของการทดลองดังกล่าว นำไซโตซอลทั้ง 2 ชุด ไปทำให้เย็น แล้วอินคิวเบทกับสารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (หัวข้อ 2.5.2 หน้า 22) หยุดปฏิกริยา เติมผงถ่าน 0.25 กรัม % อินคิวเบทต่อ 30 องศาเซลเซียส 15 นาที ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี

3.7 การทดลองหาช่วงเวลาการเก็บไซโตซอล และการสูญเสีย activity

3.7.1 การเก็บไซโตซอลที่ – 20 องศาเซลเซียส

แบ่งเก็บไซโตซอลไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน เมื่อครบเวลาดังกล่าว อินคิวเบทไซโตซอล 0.1 มล. กับสารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 (หัวข้อ 2.5.2 หน้า 22) ที่ 20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เติมผงถ่าน 0.25 กรัม % ปริมาณ 0.5 มล. ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี

3.7.2 การแช่แข็งและทำให้ละลาย (Freeze and thaw) ของไซโทซอล

เก็บไซโทซอลไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส เมื่อไซโทซอลแข็งแล้วนำมาทิ้งให้ละลาย ที่ 4 องศาเซลเซียส หลาย ๆ ครั้ง โดยแต่ละครั้งนำไซโทซอล 0.1 มล. มาอินคิวเบทกับสารมาตรฐาน 17-β $^{3}H - E_2$ (40 พิโกกรัม/0.1 มล. assay buffer) ที่ 20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังกล่าว เติมผงถ่าน 0.25 กรัม % 0.5 มล. อินคิวเบทต่อที่ 30 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วแยกเอาชั้นน้ำใสไปวัดหาสารกัมมันตรังสี

3.8 สภาพการอัมาตรฐานของการวัดปริมาณเอสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน

3.8.1 การอินคิวเบทไซโทซอลกับสารรังสี 17-β $^{3}H - E_2$ นำ 0.1 มล. ไซโทซอล มาอินคิวเบทกับ 17-β $^{3}H - E_2$ 0.1 มล. ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (หัวข้อ 2.5.2 หน้า 22) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 20 องศาเซลเซียส blank ใส่ assay buffer แทน 17-β $^{3}H - E_2$ ส่วน control ไม่ใส่ไซโทซอล ใส่ assay buffer แทน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีต่าง ๆ ใน incubation mixture

ความเข้มข้นของ 17β $^{3}H-E_2$ 0.1 มล.	ไซโทซอล มล.	assay buffer มล.	
10 – 400 พิโกกรัม	0.1	–	3 x assay tubes
10 – 400 พิโกกรัม	–	0.1	3 x control tubes
0	0.1	0.1	2 x blank tubes

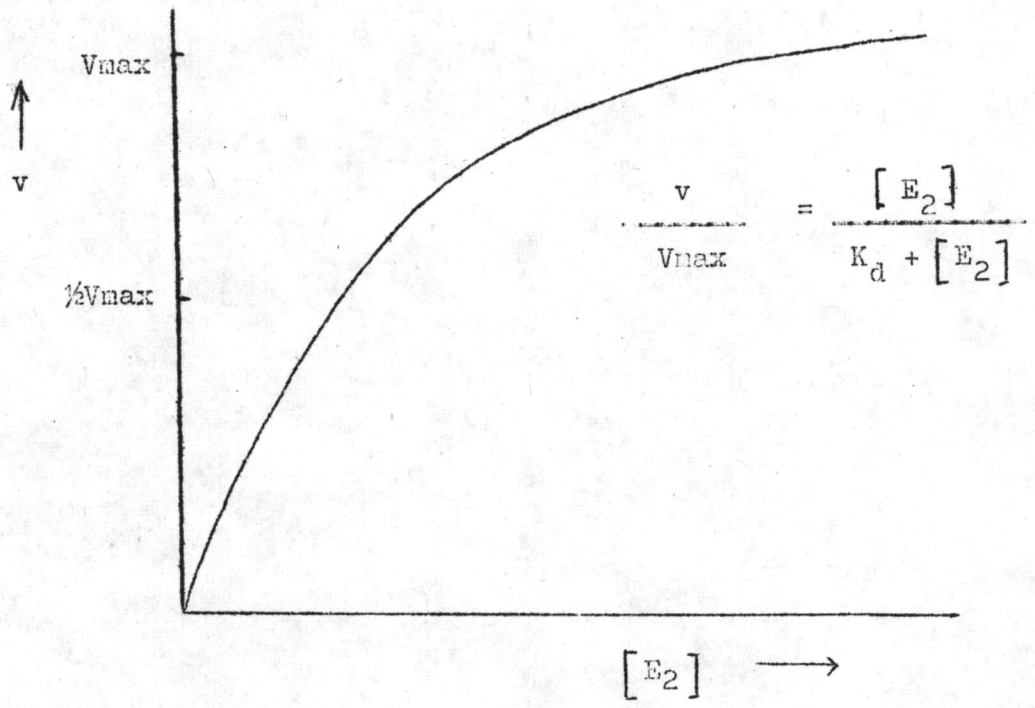
3.8.2 การแยก Bound complex (B form) ออกจาก Free form (F) เมื่ออินคิวเบทครบ 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยแช่ reaction mixture tubes ทั้งหมดในถาดน้ำแข็ง เติมสารละลายผงถ่านที่เคลือบด้วย Dextran ปริมาณ 0.5 มล. (หัวข้อ 2.2 หน้า 20) ลงใน assay tubes และ blank tubes ที่หยุดปฏิกริยาแล้วทันที เขย่าให้เข้ากัน อินคิวเบทต่อที่ 30 องศาเซลเซียส 15 นาทีใน shaking water bath ซึ่งผงถ่านจะดูดซับพวก F form ออกจาก B form (Binoux และ Odell, 1973) ปั่นแยกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 1000 x g เป็นเวลา 10 นาที F form จะตกลงมากับผงถ่าน ส่วนชั้นน้ำใสซึ่งเป็น B form นำมาเติม scintillation fluid 10 มล. (หัวข้อ 2.6 หน้า 23) วัดปริมาณกัมมันตรังสี ส่วน control tubes ใส่ assay buffer 0.5 มล. แทนผงถ่าน เติม scintillation fluid 10 มล. แล้ววัดปริมาณกัมมันตรังสี

3.9 หลักการและการคำนวณหาค่าความเข้มข้นและค่า dissociation constant (K_d) ของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน

ปฏิกริยาระหว่างฮอร์โมนอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนนั้นเป็นปฏิกริยาชนิด bimolecular ซึ่งเป็น second order association และ first order dissociation reaction (Sanborn และคณะ, 1971) กล่าวคือ

$$E_2 + R_c \rightleftharpoons E_2.R_c$$

ในเมื่อ E_2 คือฮอร์โมน R_c คือ รีเซพเตอร์ซึ่งถ้าเขียน saturation curve ได้ดังนี้



จากสมการของ Michaelis - Menten :-

$$\frac{v}{Vmax} = \frac{[E_2]}{K_d + [E_2]}$$

v = initial velocity ซึ่งเป็น function กับ $[E_2 \cdot R_c]$

V_{max} = maximum velocity V_{max} เป็น function กับ $n[R_c]t$

$n[R_c]t$ = total binding sites ของรีเซพเตอร์โปรตีน

$[E_2]$ ความเข้มข้นของฮอร์โมน

$[E_2 \cdot R_c]$ = ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีน

K_d = dissociation constant

จากสมการ (1) ถ้าจัดเรียงใหม่จะได้

$$V_{max} = \frac{vK_d}{[E_2]} + v \qquad (2)$$

หารตลอดด้วย K_d

$$\frac{V_{max}}{K_d} = \frac{v}{[E_2]} + \frac{v}{K_d} \quad (3)$$

หรือ

$$\frac{v}{[E_2]} = -\frac{v}{K_d} + \frac{V_{max}}{K_d} \quad (4)$$

สมการ (4) เรียก Eadie Scatchard equation

ถ้าแทน v ด้วย function ของ $[E_2 \cdot Rc]$ และแทนค่า V_{max} ด้วย function ของ $n[Rc]t$ จะได้

$$\frac{[E_2 \cdot R_c]}{[E_2]} = -\frac{1}{K_d}[E_2 \cdot R_c] + \frac{n[R]t}{K_d} \quad (5)$$

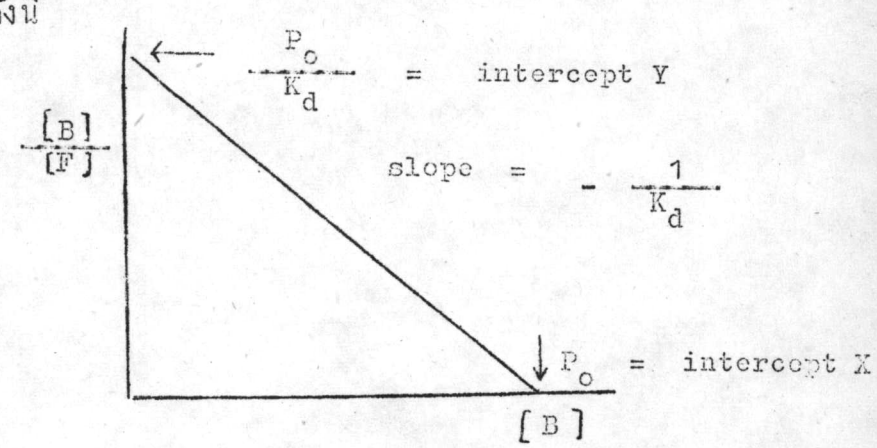
ในที่นี้ $[E_2 \cdot R_c]$ คือ ความเข้มข้นของ bound ligand ซึ่งก็คือ ความเข้มข้นของ occupied sites หรือ bound form (B) นั่นเอง

$[E_2]$ คือ ความเข้มข้นของ free ฮอร์โมน ซึ่งไม่ได้จับกับรีเซพเตอร์ให้สัญญลักษณ์ใหม่ว่า (F)

$n[R_c]t$ คือ total binding sites ของรีเซพเตอร์โปรตีน ให้สัญญลักษณ์ใหม่ว่า P_o เพื่อแทนสัญญลักษณ์ใหม่ลงในสมการ (5) จะได้

$$\frac{[B]}{[F]} = -\frac{1[B]}{K_d} + \frac{P_o}{K_d} \quad (6)$$

สมการนี้เรียก Scatchard equation (Scatchard , 1949) ถ้าทำ Scatchard plot คือ plot ระหว่าง $[B]/[F]$ กับ $[B]$ จะได้สมการเส้นตรงดังนี้



โดยปกติการจับกันของฮอร์โมนอีสโตรเจนและรีเซพเตอร์โปรตีนเป็นแบบ high affinity แต่ก็มีพวก low affinity binding complex แย่งกันจับฮอร์โมนด้วย ฉะนั้นสมการ (6) ซึ่งเป็นสมการจำเพาะของการจับกันระหว่างฮอร์โมนกับ high affinity binding sites จึงต้องเขียนใหม่ดังนี้

$$\frac{[B] + [N]}{[F]} = \frac{1}{K_d}[B] - \frac{[N]}{Kd_n} + \frac{P_o}{K_d} + \frac{Q_o}{Kd_n} \qquad (7)$$

ในเมื่อ $[N]$ คือ ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่จับกับ low affinity binding sites

Kd_n คือ issociation constant ของ low affinity binding sites

และ Q_o คือ total concentration ของ low affinity binding sites

จากสมการ (7) ถ้าในกรณีที่ปริมาณ low affinity binding complex ต่ำมาก ๆ สมการ (7) ก็คือสมการ (6) ซึ่งมีแต่กา high affinity binding complex อย่างเดียว แต่ถ้ามีพวก low affinity binding complex การขจัดพวก low affinity bindidng complex จึงจำเป็น และการใช้ผงถ่านที่เคลือบด้วยเดกซแตรนในการดูดซับพวก 17-β ^{3}H - E_2 ซึ่งแตกตัวออกมาจาก low affinity binding complex ก็เป็นวิธีการแบบหนึ่ง

สำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นและ Kd ของรีเซพเตอร์โปรตีนนั้น หลังอินคิวเบทไซโตซอล 0.1 มล. กับ 17-β ^{3}H - E_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10 - 400 พิโคกรัม/0.1 มล. assay buffer) ที่ 20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เติมผงถ่านที่เคลือบด้วย Dextran ปริมาณ 0.5 มล. อินคิวเบทที่ 30 องศาเซลเซียสต่ออีก 15 นาที ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสมาเติม scintillation fluid 10 มล. วัดปริมาณกัมมันตรังสี

สมมุติที่ความเข้มข้นของ 17-β ^{3}H - E_2 10 พิโคกรัม เมื่อนำชั้นน้ำใสที่ปั่นแยกออกมาอ่านได้ = X cpm

blank tube ของ 17-β ^{3}H - E_2 ที่จุดนี้อ่านได้ = Y cpm

ฉะนั้นที่ความเข้มข้นของ 17-β ^{3}H - E_2 ที่จุดดังกล่าวมีปริมาณของ bound form (B) = X - Y cpm

ส่วน free form สามารถคำนวณได้โดยนำ bound form ไปหักลบออกจาก total 17-β $^3H - E_2$ ซึ่งสมมุติ total 17-β $^3H - E_2$ ใน Control tube ที่ 10 พิโคกรัมเดียวกันอ่านได้ = T cpm

free form ของ 17-β $^3H - E_2$ ที่จุดกึ่งกลางอ่านได้ = T -(T-Y) cpm

เมื่อนำ B หารด้วย F ก็ได้ ratio ของ 17-β $^3H - E_2$ ที่ 10 พิโคกรัม ทำนองเดียวกัน ที่ 20, 40, 60, 80, 160, 200, 400 พิโคกรัม ก็มี ratio ของ B/F เช่นกัน นำ ratio B/F ที่จะได้จากความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 17-β $^3H - E_2$ มา plot กับ B ที่ที่จุดความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 17-β $^3H - E_2$ นั้น ตามหลักของ Scatchard Equation จะได้กราฟเป็นเส้นตรง intercept ที่แกน X คือ Total binding sites (Po) ซึ่งก็คือ ความเข้มข้นของรีเซพเตอร์โปรตีนนั่นเอง มีหน่วยเป็น cpm ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นโมล (X) ได้ โดยคำนวณจาก specific activity ของสารมาตรฐาน 17 - β $^3H - E_2$ ซึ่งเท่ากับ 85 กิวรี/มิลลิโมล

ค่า dissociation constant (Kd) หาได้จากค่า slope ซึ่งมีค่า $= -\frac{1}{Kd}$ หลังทำ Scatchard plot จุดตัดที่แกน X คือ ความเข้มข้นของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน สมมุติมีค่า = R โมล

สมมุติ ปริมาณโปรตีนและปริมาณ DNA ซึ่งหาได้ตามหัวข้อ 4 และ 5 หน้า 34

มีปริมาณโปรตีน = S มก.ไซโทซอลโปรตีน

ปริมาณ DNA = T ไมโครกรัม DNA

ดังนั้น ปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน $= \frac{R}{S}$ $\frac{\text{โมล}}{\text{มก.ไซโทซอลโปรตีน}}$

หรือ $= \frac{R}{T}$ $\frac{\text{โมล}}{\text{ไมโครกรัม}}$

$= \frac{R}{T} \times 10^6$ $\frac{\text{โมล}}{\text{พิโคกรัม}}$

แต่เนื้อเยื่อเต้านมของคนมีปริมาณ DNA /เซล = 6.5 ไมโครกรัม/10^6 เซล

= 6.5 พิโกกรัม/เซล

ดังนั้น ปริมาณฮีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนใน 1 เซล

$= 6.5 \times \frac{R}{T} \times 10^{-6}$ โมล/เซล

จาก Avogadro ' s number

1 โมลของสารใด ๆ = 6.02×10^{23} โมเลกุล

ดังนน $6.5 \times \frac{R}{T} \times 10^{-6}$ โมล/เซล จึง = $6.02 \times 10^{23} \times 6.5 \times \frac{R}{T} \times 10^{-6}$ โมเลกุล/เซล

ไบน์ดิงไซท์ /เซล

$= 3.913 \times \frac{R}{T} \times 10^{18}$ โมเลกุล/เซล

ดังนั้น ปริมาณ ไบน์ดิงไซท์/เซล

$= 3.913 \times \frac{R}{T} \times 10^{18}$

4. <u>วิธีหาปริมาณโปรตีน</u> (Lowry และคณะ, 1951)

สารละลายมาตรฐาน BSA (หัวข้อ2.3.3 หน้า 21) ความเข้มข้น 1 มก./มล. ทำให้เจือจางเป็น 10 – 120 ไมโครกรัม/0.1 มล. เติม alkaline copper solution (หัวข้อ 2.3.2 หน้า 21) 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที เติม phenol reagent (หัวข้อ 2.3.1 หน้า 21) 0.3 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดสี วัดค่า absorbance (A) ที่ความยาวคลื่น 650 nm เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนใน BSA กับค่า A ตัวอย่างไซโตซอลก็ทำตามวิธีเดียวกัน แล้วเทียบค่า A กับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก รูปที่ 19)

5. <u>วิธีหาปริมาณ</u> DNA ทำตามวิธีของ Giles และ Myers (1965) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Burton, (1955).

สารละลายมาตรฐาน calf thymus DNA (หัวข้อ 2.4.3 หน้า 22)

ความเข้มข้น 1 มก./มล. ทำให้เจือจางเป็น 10 – 20 ไมโครกรัม/1.0 มล. เติม สารละลาย diphenylamine (หัวข้อ 2.4.1 หน้า 22) ซึ่งเติม aqueous acetaldehyde (หัวข้อ 2.4.2 หน้า 22) ไว้แล้ว 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 18 ชั่วโมง วัด absorbance (A) ของสีที่เกิดขึ้นที่ ความยาวคลื่น 595 nm เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ calf thymus DNA กับค่า A

ตัวอย่าง nuclear pellet (หัวข้อ3.1 หน้า 25) นำมาสกัด DNA โดยเติม 1 M NaCl 5 ปริมาตร/น.น. (v/v) และ 5 ปริมาตร chloroform เขย่าแรง ๆ ตั้งทิ้งไว้ แยกเอาชั้น aqueous มา 1 มล. เติม สารละลาย diphenylamine ซึ่งเติม aqueous acetaldehyde แล้ว 2 มล. ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 18 ชั่วโมง วัด A ที่ความยาวคลื่น 595 nm หาปริมาณ DNA ของตัวอย่างได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก รูปที่ 20)

6. <u>การทดลองหาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนภายในก้อนเนื้อมะเร็งเต้านมก้อนเดียวกัน</u>

นำก้อนเนื้อมะเร็งเต้านมที่มีขนาดใหญ่ ตัดแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น ส่วนกลาง และ ส่วนปลาย ทำการทดลองตามหัวข้อ 3.8 หน้า 28 วัดหาปริมาณ อีสโตรเจนรีเซพเตอร์และค่า K_d ตามสมการ Scatchard

7. <u>การทดลองหาความแม่นยำของการวัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 3.7.1 หน้า 27 ซึ่งทำการทดลองโดยเก็บไซโตซอลเป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน นำไซโตซอลในแต่ละช่วงเวลามาหาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน ตามหัวข้อ 3.8 หน้า 28

8. <u>การทดสอบความบริสุทธิ์ของ 17-β ^{3}H - E_2 ที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีน</u>

(Feherty และคณะ, 1971)

อินคิวเบท 17-β ^{3}H - E_2 ซึ่งมีความเข้มข้น 40 พิโคกรัมใน 0.1 มล. assay buffer กับ 0.1 มล.ไซโทซอล ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยการแช่ในน้ำแข็ง เติมผงถ่าน 0.5 มล. ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสซึ่งเป็น bound complex ที่ 1000 x g 10 นาที สกัดสาร 17-β ^{3}H - E_2 ที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีนในชั้นน้ำใสด้วยอีเทอร์ เขย่าแรง ๆ แล้วดูดชั้นอีเทอร์มาเป่าให้แห้งเติม Benzene : Ethanol (3 : 1) ลงไป 0.4 มล. เขย่าให้เข้ากันทดสอบความบริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex LH 20 column (หัวข้อ 2.9 หน้า 24) โดยเก็บแยกส่วนละ 0.5 มล. เป็นจำนวนทั้งหมด 80 ส่วน โดยทำเทียบกับสารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 ที่มีความเข้มข้น 40 พิโคกรัม ใน 0.1 มล. assay buffer

9. <u>การวัดปริมาณ E_2 ในน้ำเหลือง</u> (สมัย ลีพิพัฒน์พบูลย์)

9.1 การสกัด E_2 ด้วยอีเทอร์ และการทำให้บริสุทธิ์ด้วย celite chromatography (Abraham, 1974)

ใช้น้ำเหลือง 1 - 3 มล. เติม 17-β ^{3}H - E_2 0.1 มล. ประมาณ 1000 cpm ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดสมดุลย์ระหว่าง ^{3}H - E_2 กับ E_2 ในน้ำเหลืองแล้วสกัด E_2 ออกด้วยอีเทอร์ 10 ปริมาตร/ปริมาตรน้ำเหลือง (v/v) เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้อีเทอร์แยกออกจากน้ำเหลืองโดยชั้นน้ำเหลืองอยู่ล่าง แช่ชั้นน้ำเหลืองลงในอาซิโตนในน้ำแข็งแห้ง (- 77 องศาเซลเซียส) ชั้นน้ำเหลืองจะแข็งตัว เทชั้นอีเทอร์ออกจากชั้นน้ำเหลืองไประเหยไอีเทอร์ออกให้หมด เติมไอโซออกเทน 1 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ดูดใส่คอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิไลท์ (หัวข้อ 2.8 หน้า 24) ผ่านกาซไนโตรเจน

ความดัน 1 – 2 ปอนด์/ตร.นิ้ว ลงในกอลัมน์ โดยเหตุที่การแยกเป็นแบบ partition chromatography โดยซีไลท์เป็นตัวยึด และ ethylene glycol เป็น stationary phase ตัว mobile phase คือ ไอโซออกเทน มี 3 ชนิด

1. ไอโซออกเทน ที่เป็น nonpolar solvent จะแยกเอา nonpolar steroids เช่น progesterone ฯลฯ ออกมา ซึ่งส่วนนี้เป็นส่วนที่ไม่ต้องการ

2. 15 % เอทิลอาซีเตท ในไอโซออกเทน ซึ่งมี polarity มากขึ้น จะแยกเอา steroids ที่ค่อนข้าง polar เช่น 17 – hydroxy progesterone ฯลฯ ออก ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ต้องการ

3. 40 % เอทิลอาซีเตท ในไอโซออกเทน มี polarity เพิ่มขึ้น จะแยกเอา steroids ที่มี polarity สูงกว่า เช่น E_2 ซึ่งเป็นส่วนที่จะหาปริมาณออกมาได้

9.2 การวัดปริมาณ E_2 ด้วยวิธี RIA

E_2 ซึ่งอยู่ใน 40 % เอทิลอาซีเตท ใน ไอโซออกเทน จาก celite microcolumn เป่าให้แห้ง เติม 1.7 มล. assay phosphate buffer (หัวข้อ 2.7.1 หน้า 23) ทิ้งไว้ 15 นาที แบ่ง 0.5 มล. เติม scintillation fluid 10 มล. วัดหาสารกัมมันตรังสี จะได้ extraction recovery ของสารตัวอย่างนั้น ส่วนอีก 0.5 มล. (duplicate) นำไปวัดปริมาณ E_2 ด้วยวิธี RIA ตามตารางที่ 2 (สมัย ลีพิพัฒนไพบูลย์, 2518)

ตารางที่ 2 วิธีวัดปริมาณ E_2 ในน้ำเหลือง

ความเข้มข้นของ E_2	สารมาตรฐาน และ สารตัวอย่าง	assay phosphate buffer มล.	antibody** (มล.) (1 : 100,000)	$17\beta^3H$-E_2*** 56พิโคกรัม (มล.)	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)
blank	–	0.6	–	0.1	0.7
0 พิโคกรัม	–	0.5	0.1	0.1	0.7
* 25–100พิโคกรัม	0.5	–	0.1	0.1	0.7
สารตัวอย่าง	0.5	–	0.1	0.1	0.7

* เตรียมได้ตามหัวข้อที่ 2.7.5 หน้า 24

** เตรียมได้ตามหัวข้อที่ 2.7.4 หน้า 24

*** เตรียมได้ตามหัวข้อที่ 2.7.3 หน้า 24

เสร็จแล้วนำไปอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงเติมสารละลายผงถ่านที่เคลือบด้วย Dextran (หัวข้อที่ 2.7.2 หน้า 23) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในถาดน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี

9.3 วิธีคำนวณหาปริมาณ E_2 ในน้ำเหลือง

สมมุติให้ $17\text{-}\beta\ ^3H\text{-}E_2$ ที่เติมลงไปในน้ำเหลืองก่อนสกัดด้วยอีเทอร์

= a cpm

หลังสกัดด้วยอีเทอร์แล้วผ่าน column เรียบร้อยแล้ว เติม assay buffer 1.7 มล. แบ่ง 0.5 มล. ไปหา recovery สมมุติวัดปริมาณกัมมันตรังสีได้

= b cpm

$$\% \text{ fraction recovery} = \frac{b}{a} \times 100$$

= c %

และอีก 0.5 มล. นำไปวัดปริมาณ E_2 จากกราฟมาตรฐานได้ = d พิโคกรัม

มีเนื้อสาร = d พิโคกรัม

ถ้า 100 % มีเนื้อสาร = $\frac{d}{c} \times 100$ พิโคกรัม

= X พิโคกรัม