วัสดุและวิธีดำเนินการ

1. สารเคมี

LER 907[1], LER 960[2] [National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases]

Sodium [^{125}I] iodide, [The Radiochemical Centre, Amersham, England.]

Rabbit anti-LH serum, [National Institutes of Health, U.S.A.]

Donkey anti-rabbit serum, [Burroughs wellcome high titre precipitating antiserum, Cataloque No. MR 66.]

Normal rabbit serum, [Commonwealth Serum Laboratories, Australia.]

Activated charcoal (Norit A), Laboratory reagents, particle size 4-5 μ, ashes 2.9%, [Serva, Germany.]

Bovine Serum Albumin (BSA), crystallized and Lyophilized, [Sigma Chemical Company.]

di-Sodium hydrogen orthophosphate (anhydrous), Analar; sodium dihydrogen orthophosphate, Laboratory reagents; ethylenediamine-tetra-acetic acid (disodium salt), Laboratory reagents; sodium metabisulphite, Laboratory reagents; potassium iodide; barbitone sodium, Laboratory reagents [B.D.H., England]

Sodium azide; sodium hydroxide, Reagent grade; p-toluene sulfonamide chloride (chloramine T, trihydrate), pro analysi; hydrochloric acid, pro analysi. [E. Merck AG. Darmstadt, Germany]

Sodium chloride, Analytical reagent; boric acid, Analytical reagent. [Mallinckrodt]

---

1 = LH มาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐาน

2 = LH มาตรฐานสำหรับ iodination

Sephadex G–75; dextran T 110, 150, 250. [Pharmacia Fine Chemicals]

Potassium chloride, Laboratory reagents, [May and Baker.]

Thionersal, B.P., [Lake and Cruickshank.]

2. เครื่องมือที่ใช้

Autogamma Spectrometer, Model 3375, Packard, U.S.A.

pH Meter, Model 39, Coleman, U.S.A.

Vari–Whirl Mixer, Cat. No. 58810–006, Van Waters and Rogers, Will Scientific, U.S.A.

Magnetic Stirrer, No. 71/4061, Brid and Tatlock (London) Limited, England.

Centrifuge, Model P.R. 6, International Equipment; U.S.A.

3. ซีรัม

ซีรัมที่ใช้เป็นสารตัวอย่างหาปริมาณ LH ในรอบเดือน เป็นซีรัมของผู้อาสาสมัครที่ทำงานอยู่ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ นักศึกษาแพทย์ และผู้ที่ทำงานนอกโรงพยาบาล ซึ่งแพทย์ทำการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นคนสุขภาพปกติ เจาะเลือดตอนเช้า เวลา 7.00–8.00 นาฬิกา วันที่ 2, 8, 13–17 และ 21–24 ของรอบเดือน และต้องวัด basal body temperature (BBT) ทุกวัน ตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ (4–5 เดือน) เลือดซึ่งเจาะได้เก็บไว้ที่ 4 °ซ 1 วัน แล้วจึงปั่นแยกซีรัมออก ซีรัมที่ได้เก็บไว้ที่ –40 °ซ

ซีรัมที่ใช้ทำ pooled serum แบ่งเป็น 3 พวก

ก. ค่าสูง ได้จากซีรัมของสตรี มีค่าประมาณ 300 นาโนกรัม/มล.

ข. ค่ากลาง ได้จากซีรัมในข้อ ก. ที่นำมาเจือจาง 3 เท่าด้วยซีรัมที่กำจัด LH ออกหมดแล้ว มีค่าประมาณ 100 นาโนกรัม/มล.

ค. ค่าต่ำ ได้จากซีรัมของผู้ชาย มีค่าประมาณ 20 นาโนกรัม/มล.

pooled serum ได้จากศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย และธนาคารเลือดของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

4. การเตรียมสาร

4.1 0.5 M Phosphate buffer pH 7.5

ใช้ disodium hydrogen orthophosphate 30 กรัม
sodium dihydrogen orthophosphate 6.24 กรัม
sodium azide 100 มก.

เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 500 มล. จะได้สารละลายมี pH 7.5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.2 1% BSA - 0.01 M phosphate buffer + 0.14 M sodium chloride + 0.05 M ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) pH 7.0

ใช้ 10 มล. ของ phosphate buffer ข้อ 4.1 เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 500 มล. ละลาย sodium chloride 4.09 กรัม และ EDTA 9.306 กรัม ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 2 N Sodium hydroxide ละลาย BSA 5 กรัม ใน buffer นี้ เก็บไว้ที่ 4 °ซ

4.3 0.01 M phosphate saline buffer pH 7.5

ใช้ 10 มล. ของ phosphate buffer ข้อ 4.1 เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 500 มล. ละลาย sodium chloride 4.09 กรัม จะได้สารละลายมี pH 7.5 เก็บไว้ที่ 4 °ซ

4.4 0.05 M phosphate buffer pH 7.5

ใช้ 50 มล. ของ buffer ข้อ 4.1 เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 500 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.5 0.05 M phosphate saline buffer pH 7.5

ใช้ 50 มล. ของ buffer ข้อ 4.1 เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 500 มล. ละลาย sodium chloride 2.932 กรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.6 0.5% BSA - 0.05 M phosphate buffer pH 7.5

ใช้ BSA 2.5 กรัม เติม buffer ในข้อ 4.4 ลงไปจนครบ 500 มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ

4.7 5% BSA – 0.05 M phosphate saline buffer pH 7.5

ใช้ BSA 2 กรัม เติม buffer ในข้อ 4.5 ลงไปจนครบ 40 มล. เก็บไว้ที่ 4°ซ

4.8 0.5% BSA – 0.05 M phosphate saline buffer pH 7.5

ใช้ 5 มล. ของ buffer ข้อ 4.7 เติม buffer ในข้อ 4.5 ลงไปจนครบ 50 มล. เก็บไว้ที่ 4°ซ

4.9 LER 907 (LH มาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐาน)

ใช้ 1 มก. LER 907 เติม buffer ในข้อ 4.3 จนครบ 1 มล. นำสารละลายที่ได้นี้มา 0.1 มล. เติม buffer ข้อ 4.6 ลงไปจนครบ 100 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/0.1 มล. เก็บไว้ที่ –40° ซ

4.10 LER 960 (LH มาตรฐานสำหรับ iodination)

ใช้ 200 ไมโครกรัม LER 960 เติม buffer ในข้อ 4.3 จนครบ 1 มล. แบ่งเก็บไว้ในหลอดทดลองเล็ก หลอดละ 25 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นของสาร 5 ไมโครกรัม เก็บไว้ที่ –40°ซ

4.11 Rabbit anti - LH serum (แอนติบอดีชนิดที่หนึ่ง) ความเข้มข้นเดิม 1 : 2

ใช้ 1 มล. เติม buffer ในข้อ 4.6 ลงไปจนครบ 50 มล. จะได้ความเข้มข้น 1 : 100 เก็บไว้ที่ –40°ซ

Radioimmunoassay ของ LH โดยใช้เทคนิคการแยกด้วยแอนติบอดีสองชนิด เตรียมแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งดังนี้ ใช้ 0.1 มล. (1 :100) เติม buffer ในข้อ 4.2 ลงไปจนครบ 6.65 มล. จะได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีในหลอดทดลอง (final dilution) 1 : 27,000

Radioimmunoassay ของ LH โดยใช้เทคนิคการแยกด้วยผงถ่าน เตรียมแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งดังนี้ ใช้ 0.1 มล. (1 :100) เติม buffer ในข้อ 4.6 ลงไปจนครบ 6 มล. จะได้ความเข้มข้นในหลอดทดลอง 1 : 40,000

การเตรียมความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งตามลำดับ (serial dilution) เมื่อใช้เทคนิคการแยกด้วยผงถ่าน

ใช้แอนติบอดีชนิดที่หนึ่ง 0.5 มล. (1: 100) เติม buffer ในข้อ 4.6 ลงไปจนครบ 10 มล. จะได้ความเข้มข้นในหลอดทดลอง 1: 10,000

ใช้ 5 มล. (1: 10,000) ใส่ในบีเกอร์ขนาด 15 มล. ที่มี buffer ข้อ 4.6 อยู่แล้ว 5 มล. จะได้ความเข้มข้นในหลอดทดลอง 1 : 20,000

ใช้ 5 มล. (1 : 20,000) ใส่ในบีเกอร์ขนาด 15 มล. ที่มี buffer ข้อ 4.6 อยู่แล้ว 5 มล. จะได้ความเข้มข้นในหลอดทดลอง 1 : 40,000

ทำวิธีนี้ต่อไปเรื่อย ๆ จะได้ความเข้มข้นในหลอดทดลองของแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งตามลำดับ คือ 1 : 10,000; 1 :20,000; 1: 40,000 ; 1 :80,000 ; 1 : 160,000

4.12 Donkey anti-rabbit serum (แอนติบอดีชนิดที่สอง)

ใช้ 1 มล. เติม buffer ในข้อ 4.2 ลงไปจนครบ 10 มล. จะได้ความเข้มข้นในหลอดทดลอง 1: 60

4.13 Normal rabbit serum

ใช้ 0.1 มล. เติม buffer ข้อ 4.2 ลงไปจนครบ 10 มล. จะได้ความเข้มข้นในหลอดทดลอง 1: 600

4.14 Chloramine - T

ชั่ง 0.025 กรัม เติม buffer ข้อ 4.5 ลงไปจนครบ 5 มล. เตรียมทันทีก่อนใช้

4.15 Sodium metabisulphite

ชั่ง 0.005 กรัม เติม buffer ข้อ 4.5 ลงไปจนครบ 5 มล. เตรียมทันทีก่อนใช้

4.16 Potassieum iodide

ชั่ง 0.5 กรัม เติมbufferข้อ 4.5 ลงไปจนครบ 5 มล.

4.17 การเตรียมความเข้มข้นของผงถ่านเคลือบด้วยเดกซ์แตรน (dextran coated charcoal)

ชั่งเดกซ์แตรน 2 กรัม เติม buffer ในข้อ 4.4 ลงไปจนครบ 200 มล. จะได้ความเข้มข้นของเดกซ์แตรน 1% (w/v) จากนั้นเตรียมเดกซ์แตรนที่มีความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.0156 และ 0.0078 เปอร์เซนต์ ตามลำดับจากเดกซ์แตรน 1% เช่นเดียวกับข้อ 4.11

เตรียมผงถ่าน 1% เคลือบด้วยเดกซ์แตรน 1% โดยชั่งผงถ่าน 1 กรัม เติมเดกซ์แตรน 1% ลงไปจนครบ 100 มล.

ถ้าใช้ถ่าน 2% ชั่งถ่าน 2 กรัม ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนถึง 8% ชั่งถ่าน 8 กรัม และนำมาผสมกับความเข้มข้นของเดกซ์แตรน 100 มล. จะได้ความเข้มข้นของผงถ่านเคลือบด้วยเดกซ์แตรนตามต้องการ (นำขนาดของเดกซ์แตรนที่ต้องการใช้มาเตรียม)

4.18 เตรียมความเข้มข้นของผงถ่านเคลือบด้วย BSA

เตรียมเช่นเดียวกับเดกซ์แตรนข้อ 4.17 ทุกประการ

4.19 เตรียมความเข้มข้นของผงถ่าน 1-8%

เตรียมถ่าน 1% ชั่งผงถ่าน 1 กรัม เติม buffer ข้อ 4.4 100 มล.

เตรียมถ่าน 2% ชั่งผงถ่าน 2 กรัม เติม buffer ข้อ 4.4 100 มล.

ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ความเข้มข้นของถ่านครบตามต้องการ

4.20 0.5% BSA – 0.05 M Phosphate buffer pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8 และ 8.5

สารละลาย ก. ชั่ง disodium hydrogen orthophosphate 14.2 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 100 มล.

สารละลาย ข. ชั่ง sodium dihydrogen orthophosphate 15.6 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 100 มล.

เตรียม 0.5 M phosphate buffer pH ต่าง ๆ ดังนี้

สารที่ใช้ \ pH	6	6.5	7	7.5	8	8.5
สารละลาย ก. (มล.)	5	10	16	21	22.5	24.5
สารละลาย ข. (มล.)	20	15	9	4	1.5	0.5
sodium azide (มก.)	10	10	10	10	10	10

เตรียม 0.05 M phosphate buffer pH ดังกล่าวแล้ว โดยนำสารที่เตรียมได้มา 5 มล. เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 50 มล.

เตรียม 0.5 % BSA – 0.05 M phosphate buffer โดยชั่ง BSA 0.25 กรัม ละลายใน 0.05 M phosphate buffer 50 มล. จะได้ BSA - phosphate buffer มี pH ตามต้องการ

4.21 0.5 % BSA – 0.05 M barbitone sodium buffer pH 7, 8, 9 และ 10

สารละลาย ก. ชั่ง barbitone sodium 10.3 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 500 มล.

สารละลาย ข. ใช้ hydrochloric acid 8.7 มล. เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 100 มล.

เตรียม 0.1 M barbitone sodium buffer pH ต่างๆดังนี้

สารที่ใช้ \ pH	7	8	9	10
สารละลาย ก. (มล.)	54	70	96	99.5
สารละลาย ข. (มล.)	46	30	4	0.5
thiomersal (มก.)	20	20	20	20

เตรียม 0.05 M barbitone sodium buffer ให้มี pH ดังกล่าว โดยนำสารละลายที่เตรียมได้มา 25 มล. เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 50 มล.

เตรียม 0.5 % BSA – 0.05 M barbitone sodium buffer โดยชั่ง BSA 0.25 กรัม ละลายใน 0.05 M barbitone sodium buffer จะได้ BSA - barbitone sodium buffer มี pH ตามต้องการ

4.22 0.5% BSA - 0.05 M borate buffer pH 7, 8, 9 และ 9.5

สารละลาย ก. ชั่ง boric acid 3.1 กรัม และ potassium chloride 3.73 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล.

สารละลาย ข. ชั่ง sodium hydroxide 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

เตรียม 0.1 M borate buffer pH ต่าง ๆ ดังนี้

สารที่ใช้ \ pH	7	8	9	9.5
สารละลาย ก. (มล.)	50	50	50	50
สารละลาย ข. (มล.)	0.8	3.7	21.6	50
thiomersal (มก.)	20	20	20	20
น้ำกลั่น (มล.)	49.2	46.3	28.4	-

เตรียม 0.05 M borate buffer ให้มี pH ดังกล่าว โดยนำสารละลายที่เตรียมได้มา 25 มล. เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 50 มล.

เตรียม 0.5 % BSA - 0.05 M borate buffer โดยชั่ง BSA 0.25 กรัม ละลายใน 0.05 M borate buffer จะได้ BSA-borate buffer มี pH ตามต้องการ

4.23 ^{125}Iodine - LH (^{125}I-LH)

ใช้วิธี chloramine T ดัดแปลงจากวิธีของ Greenwood และ Hunter (1963) และ Midgley (1966) หลักการคือ ให้ chloramine T oxidize iodide เป็น iodine iodine มีความสามารถจะไปจับกับ LH ต่อจากนั้นใส่ sodium metabisulphite เพื่อ reduce iodine ที่มากเกินพอเป็น iodide ทำให้ปฏิกริยาสิ้นสุดลง

วิธีเตรียม (iodination)

ผสม LER 960 25 ไมโครลิตร (5 ไมโครกรัม), 0.5 M

phosphate buffer pH 7.5 25 ไมโครลิตร , sodium $[^{125}I]$ iodide 10 ไมโครลิตร (1 มิลลิคิวรี) และ chloramine T 10 ไมโครลิตร (50 ไมโครกรัม) เข้าด้วยกันใช้เวลา 30 วินาที หลังจากใส่ chloramine T ใส่ sodium metabisulphite 60 ไมโครลิตร (60 ไมโครกรัม) และ potassium iodide 100 ไมโครลิตร (1 มก.) ผ่านสารที่เตรียมได้ในคอลัมน์ sephadex G - 75 ขนาด 0.9 x 25 ซม. อัตราการไหล 0.3 มล. / นาที คอลัมน์นี้ equilibrate ด้วย 5 % BSA buffer ข้อ 4.7 ก่อนผ่านสารที่ iodinate ได้ และ elute ด้วย 0.5% BSA buffer ข้อ 4.8

เก็บส่วนที่ออกมาหลอดที่ 1 (tube number 1) 5 มล. (void volume) หลอด ที่ 2 – 30 เก็บหลอดละ 0.5 มล. ในหลอดที่มี 5% BSA buffer ข้อ 4.7 อยู่หลอดละ 0.25 มล. นำ 10 ไมโครลิตรของทุกหลอดไปวัดรังสีโดยเครื่อง Autogamma Spectrometer วัดเป็น count / นาที

4.24 <u>การกำจัดฮอร์โมนออกจากซีรัม</u>

ใช้ซีรัม 100 มล. เติมผงถ่าน 0.25 กรัม เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงที่ 2000 รอบ / นาที เป็นเวลา 20 นาที และแยกส่วนน้ำใส (supernatant) ออกมา ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อแยกผงถ่านออกให้หมดจริง ๆ ก็จะได้ซีรัมที่กำจัด LH ออก (hormone free serum, HFS)

5. วิธีวัดปริมาณความเข้มข้นของ LH

หลักการมีอยู่ว่า ให้ฮอร์โมนที่เป็นกัมมันตภาพรังสี และฮอร์โมนที่มีอยู่ในซีรัม ทำปฏิกริยากับแอนตีบอดี อินคิวเบทระยะเวลาหนึ่ง แล้วแยกส่วนที่ทำปฏิกริยาและส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยาออกจากกันด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง หรือ adsorbent วัดกัมมันตภาพรังสีของสารส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (free) ใช้อักษรย่อ F และส่วนที่ทำปฏิกริยา (bound) ใช้อักษรย่อ B ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เขียนกราฟระหว่าง B% กับความเข้มข้นของฮอร์โมนปริมาณต่างๆกัน วิธีการทดลองโดยละเอียดมีดังต่อไปนี้

5.1 วิธีเตรียมความเข้มข้นของ LER 907

เตรียมจากสารละลาย LER 907 ข้อ 4.9 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ 0.1 มล. ทำ serial dilution ตามวิธีข้อ 4.11 จะได้ความเข้มข้นในแต่ละหลอดทดลองตามต้องการดังนี้

หลอดที่ 1	25.00	นาโนกรัม/0.05	มล.	หรือ	50.00	นาโนกรัม/0.1 มล.
หลอดที่ 2	12.50	นาโนกรัม/0.05	มล.	หรือ	25.00	นาโนกรัม/0.1 มล.
หลอดที่ 3	6.25	นาโนกรัม/0.05	มล.	หรือ	12.50	นาโนกรัม/0.1 มล.
หลอดที่ 4	3.13	นาโนกรัม/0.05	มล.	หรือ	6.25	นาโนกรัม/0.1 มล.
หลอดที่ 5	1.56	นาโนกรัม/0.05	มล.	หรือ	3.13	นาโนกรัม/0.1 มล.

การแยกด้วยผงถ่านใช้ 0.5% BSA buffer ข้อ 4.6

การแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สองใช้ 1% BSA buffer ข้อ 4.2

5.2 วิธีวัด

ก. Radioimmunoassay ของ LH โดยใช้เทคนิคการแยกด้วยผงถ่าน (charcoal separation technique)

ทำกราฟมาตรฐานดังนี้

น้ำยา	Control tube (มล.)	Tube No. 0 (มล.)	Tube No. 1-6 (มล.)
buffer (ข้อ 4.6)	0.25	0.15	0.1
LH มาตรฐาน (ข้อ 5.1)	-	-	0.05
แอนติบอดี (ข้อ 4.11)	-	0.1	0.1
^{125}I-LH (100 พิโคกรัม/0.05 มล.)	0.05	0.05	0.05
HFS (ข้อ 4.24)	0.2	0.2	0.2

อินคิวเบทที่ 4°ซ 4 วัน เติมถ่าน 3% ข้อ 4.19 หลอดละ 0.5 มล. นำไปปั่นที่ 4°ซ ด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสออกจากถ่าน วัดกัมมันตภาพรังสีของสารทั้งสองส่วน

ส่วนถ่าน จะเป็นส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (F)

ส่วนน้ำใส เป็นส่วนที่ทำปฏิกริยา (B)

ข. Radioimmunoassay ของ LH โดยเทคนิคการแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง (second antibody separation technique) ทำกราฟมาตรฐานดังนี้

น้ำยา	Control tube (มล.)	Tube No. 0 (มล.)	Tube No. 1-6 (มล.)
buffer (ข้อ 4.2)	0.15	0.05	-
LH มาตรฐาน (ข้อ 5.1)	-	-	0.05
แอนตีบอดีชนิดที่หนึ่ง (ข้อ 4.11)	-	0.1	0.1
^{125}I - LH (100 พิโคกรัม/0.05 มล.)	0.05	0.05	0.05
HFS (ข้อ 4.24)	0.2	0.2	0.2

อินคิวเบทที่ 4°ซ เป็นเวลา 2 วัน นำออกมาใส่แอนตีบอดีชนิดที่สอง ข้อ 4.12 และ normal rabbit serum ข้อ 4.13 อย่างละ 0.1 มล.ทุกหลอด

อินคิวเบทต่อที่ 4°ซ อีก 2 วัน จึงนำออกมาใส่ buffer ข้อ 4.5 หลอดละ 1 มล.ทุกหลอด และนำไปปั่นที่ 4°ซ ด้วยอัตราเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที รินแยกส่วนน้ำใสออก วัดกัมมันตภาพรังสีของส่วนที่เป็นตะกอน

ส่วนน้ำใส คือส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (F)

ตะกอน คือส่วนที่ทำปฏิกริยา (B)

หมายเหตุ 1. การหาปริมาณ LH จากซีรัม ทำพร้อมกับกราฟมาตรฐาน แต่จะใส่ซีรัม 0.2 มล. แทน HFS

2. การเติม ^{125}I-LH พร้อมกับแอนตีบอดีและ LH มาตรฐาน เรียกว่า สภาวะสมดุลย์ ถ้าเติมหลังจากอินคิวเบทแอนตีบอดีและ LH มาตรฐาน ที่ 4°ซ. เป็นเวลา 1 วัน เรียกว่าสภาวะไม่สมดุลย์

3. ในบางการทดลองใช้ปริมาตรของ LH มาตรฐาน 0.1 มล. ปริมาตรของสารที่ใช้จะเปลี่ยนไปดังนี้คือ

HFS	0.1 มล.
^{125}I-LH	0.1 มล.
แอนตีบอดี	0.1 มล.
และ buffer	0,1 มล.

ปริมาตรทั้งหมดในการทดลอง เมื่อใช้เทคนิคการแยกด้วยผงถ่าน = 0.5 มล. เมื่อใช้เทคนิคการแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง = 0.4 มล.

6. การคำนวณ specific activity ของ ^{125}I-LH ที่ได้จาก iodination (รูปที่ 2)

ให้ปริมาณรังสีที่วัดได้ทั้งหมด (หลอดที่ 1-30) = A cpm = 100%*

ปริมาณรังสีที่วัดได้ใน peak ของโปรตีน (หลอดที่ 1-18) = B cpm

$$= \frac{100\ B\%}{A}$$

$$= \frac{1000B}{A} \text{ ไมโครคิวรี/5ไมโครกรัม LH}$$

$$\therefore \text{ Specific activity} = \frac{1000B}{5A} \text{ ไมโครคิวรี/ไมโครกรัม LH}$$

100% = ปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีทั้งหมดที่ใช้ iodination

specific activity ที่ได้จากการคำนวณในหน้า 20 เป็นวิธีคำนวณที่ใช้ในการทดลองตลอดรายงานนี้ แต่วิธีการคำนวณที่ถูกต้องและใกล้เคียงกับความจริง มีดังนี้

ให้ปริมาณรังสีที่ผ่านคอลัมน์ทั้งหมด และที่ติดอยู่กับ

หลอดทดลอง(total) = A cpm

= 1 มิลลิคิวรี

และมีปริมาณของ LH อยู่ = 5 ไมโครกรัม

ปริมาณรังสีที่ผ่านคอลัมน์ทั้งหมด = B cpm

= $\frac{B}{A}$ มิลลิคิวรี

และมีปริมาณของ LH อยู่ = $\frac{5B}{A}$ ไมโครกรัม

ปริมาณรังสีที่วัดได้ใน peak ของโปรตีน = C cpm

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

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

$\therefore$ specific activity = $\frac{1000C}{5B}$ ไมโครคิวรี/ไมโครกรัม

7. <u>การคำนวณปริมาณ LH ที่มีอยู่ในแต่ละหลอดของ ^{125}I – LH จากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1</u> (รูปที่ 2)

ปริมาณรังสีที่วัดได้ใน peak ของโปรตีน = B cpm
(หลอดที่1–18) = LH 5 ไมโครกรัม

ปริมาณรังสีที่วัดได้ในแต่ละหลอด = D cpm

$= \frac{100D}{B}$ %

$= \frac{5D}{B}$ ไมโครกรัม/0.75 มล.

$= \frac{5000D}{0.75B}$ นาโนกรัม/มล.

= X นาโนกรัม/มล.

เตรียม 100 พิโคกรัม/0.1 มล. ต้องเจือจาง 1 : X

เตรียม 100 พิโคกรัม/0.05 มล. ต้องเจือจาง 1 : $\frac{X}{2}$

8. <u>การคำนวณปริมาณ LH ที่มีอยู่ในแต่ละหลอดของ ^{125}I – LH จากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2</u> (รูปที่ 3)

ให้ปริมาณ LH ที่นำมาทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 = a นาโนกรัม

ปริมาณรังสีที่วัดได้ใน peak ของโปรตีน = E cpm
(หลอดที่1–30) = a นาโนกรัม

ปริมาณรังสีที่วัดได้ในแต่ละหลอด = H cpm

$= \frac{100H}{E}$ %

$= \frac{aH}{E}$ นาโนกรัม/มล.

= Y นาโนกรัม/มล.

เตรียม 100 พิโคกรัม/ 0.1 มล. ต้องเจือจาง 1 : Y

เตรียม 100 พิโคกรัม/ 0.05 มล. ต้องเจือจาง 1 : $\frac{Y}{2}$

9. <u>การคำนวณความไวในการวัด</u> (sensitivity)

ใช้วิธีของ Ekins และ Newman (1970)

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{Statistical error}}{\text{Slope}}$$

9.1 <u>วิธีหาเปอร์เซนต์ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ</u> (% Statistical error)

ก. หาอัตราส่วน F/B ทุกจุดที่ทำกราฟมาตรฐาน และค่าเฉลี่ย

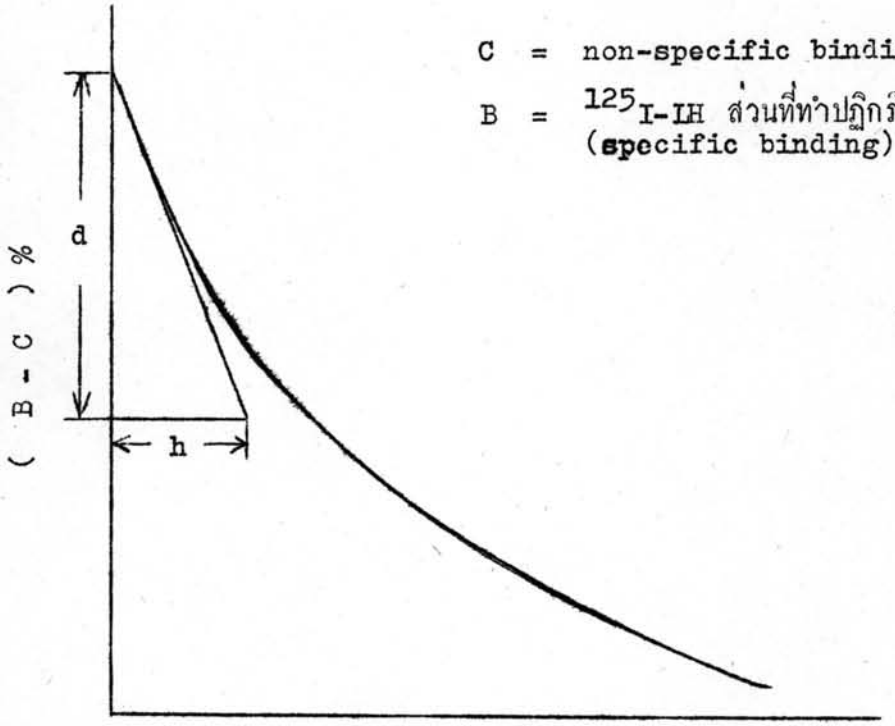
ข. หา % ความแตกต่าง และค่าเฉลี่ย จะได้ความคลาดเคลื่อนทางสถิติเฉลี่ย

9.2 <u>วิธีหาความชันของกราฟมาตรฐาน</u> (Slope)

ก. เขียนกราฟระหว่าง (B-C)% กับความเข้มข้นของ LH มาตรฐาน โดยใช้กราฟธรรมดา

ข. จากกราฟรูปที่หนึ่ง หาค่าความชันได้ $= \frac{d}{h}$

<u>รูปที่ 1</u> แสดงวิธีหาความชันจากกราฟมาตรฐานของ LH ในส่วนที่มีค่าต่ำสุด เพื่อจะหาความไวในการวัด



10. <u>การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ของค่าเฉลี่ย (mean)</u>

ความกระจายของค่าเฉลี่ยวัดเป็นความแปรปรวน = S^2

รากที่สองของความแปรปรวน = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

Xi = ปริมาณของ LH เป็นนาโนกรัม/มล.

n = จำนวนซีรัมตัวอย่าง

ส่วนเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย (d) = $Xi - \bar{X}$

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) = $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (Xi - \bar{X})^2}{n-1}}$

ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) = $\frac{SD}{\sqrt{n-1}}$

11. <u>การคำนวณ percentage recovery</u>

สมมติปริมาณ LH ใน pooled serum = A นาโนกรัม/มล.

ปริมาณ LH มาตรฐานที่เติมลงไป = B นาโนกรัม/มล.

ปริมาณ LH ทั้งหมดที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน = X นาโนกรัม/มล.

percentage recovery = $\frac{X}{A+B} \times 100$