บทที่ 2

อุปกรณ์และการวิจัย

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) ของบริษัท Snijders scientific, model 21/9104 จากประเทศฮอลแลนด์

2. อุปกรณ์ชุดเจลอิเล็กโตรฟอเรซีส (gel electrophoresis) LKB Bromma จากประเทศสวีเดน

3. เครื่องยูวี สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV Spectrophotometer) model HP 8452 A จากประเทศสหรัฐอมเริกา

4. เครื่องทำแห้ง (Freeze Dryer) YAMATO จากประเทศญี่ปุ่น

5. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ORION model 520 A จากประเทศสหรัฐอเมริกา

6. เครื่องเขย่า (Shaker) ของบริษัท Arthur H. Thomas ประเทศสหรัฐอเมริกา

7. เครื่องนับรังสีแกมมา (Gamma Counter) RIA STAR model A 5410 จากประเทศสหรัฐอเมริกา

8. เครื่องปั่นแยก 4 ^{o} ซ (Refrigerated Centrifuge) HIMAC HITACHI จากประเทศญี่ปุ่น

9. เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer) GENIE 2 scientific industry จากประเทศสหรัฐอเมริกา

10.เครื่องเก็บสาร (Fraction collector) ADVANTEC MODEL SF-160 YAMATO SCIENTIFIC จากประเทศญี่ปุ่น

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50,100,250 และ 4,000 มิลลิลิตร

2. แท่งคน (stirring rod)

3. คอลัมน์แก้ว (glass column) ขนาด 1.5 ซม. x 30 ซม.

4. แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar)

5. หลอดทดลองขนาดเล็ก (test tubes)

6. กระดาษวัดพีเอช 1-14 (pH paper)

7. ปิเปต (autopipette) eppendorf ขนาด 25, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 ไมโครลิตร

8. ถุงไดอะไลซีส (dialysis bag) ขนาด 15.9 มม. MW cutoff 20-20,000

9. แร็ก (rack) สำหรับใส่หลอดทดลอง

10. หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มล.

11. เข็มฉีดยา (needle) เบอร์ 22 และ 25 x 1.5 นิ้ว

12. กรอบแก้ว (glass frame) สำหรับเตรียมเจลขนาด 10 x 10 ซม.

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ธัยรอกซิน (thyroxine,T4) ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

2. 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอมิโนโพรพิล) คาร์โบไดอิมีด ไฮโดรคลอไรด์(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride,EDCI) รีเอเจนต์เกรดของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

3. โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin,BSA) ของบริษัทซิกมาจากประเทศสหรัฐอเมริกา

4. ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (human serum albumin,HSA) จากประเทศสหรัฐอเมริกา

5. โพลี-ดี-ไลซีน (poly-D-lysine) ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ของบริษัทเมอร์ค จากประเทศเยอรมนี

7. แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต (ammonium bicarbonate) ของบริษัทเมอร์ค จากประเทศเยอรมนี

8. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide,DMF) ของบริษัทเมอร์คจากประเทศเยอรมนี

9. ไพริดีน (pyridine) ของบริษัทฟลูกา จากประเทศสวิสเซอร์แลนด์

10. ฟรอยด์ แอดจูแวนต์ ชนิดสมบูรณ์ และไม่สมบูรณ์ (Complete & Incomplete Freund's adjuvant, CFA & IFA) ของบริษัทดิฟโก ลาบอราทอรีส์ จากประเทศสหรัฐอเมริกา

11. อะคริลเอมีด (acrylamide) ของบริษัทเมอร์ค จากประเทศเยอรมนี

12. ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

13. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulphate,SDS) ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

14. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulphate) ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

15. เตราเอทิล เมทิลีน ไดเอมีน (tetraethyl methylene diamine,TEMED) ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

16. ซูโครส (sucrose) ของบริษัทเมอร์ค จากประเทศเยอรมนี

17. เมอร์แคปโตเอทานอล (mercaptoethanol) ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

18. บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue,BPB) ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

19. โปรตีนมาตรฐาน (standard proteins) ขนาดโมเลกุล 14,100-94,000 ดาลตัน ของบริษัทซิกมา จากประเทศสหรัฐอเมริกา

20. ไกลซีน (glycine) ของบริษัทเมอร์ค จากประเทศเยอรมนี

21. คูมาซี บริลเลียน บลู (coomasie brilliant blue,C.B.B.) ของบริษัทซิกมาจากประเทศสหรัฐอเมริกา

22. เมทานอล (methanol) ของบริษัทเบเกอร์ อนาไลซ์ จากประเทศเยอรมนี
23. กรดอะซิติก (glacial acetic) ของบริษัทเมอร์ค จากประเทศเยอรมนี

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 <u>การสังเคราะห์อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โปรตีน คอนจูเกต</u>

2.4.1.1 สังเคราะห์ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (Erlanger และคณะ, 1957 : Goodfriend และคณะ, 1964)

ละลายธัยรอกซิน (L-thyroxine,T4) 10.00 มก. (1.29×10^{-5} โมล) ใน 0.01 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 ไมโครลิตร เติมสารกัมมันตภาพรังสีธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 (thyroxine-I-125, T4-I125)* 5 ไมโครลิตร (100,000-150,000 cpm) เติมตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 500 ไมโครลิตร ตามด้วย โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน 0.80 มก. (0.117×10^{-7}โมล) เขย่าสารละลายดังกล่าวด้วยเครื่องผสมสารจนไม่มีตะกอนเกิดขึ้นในสารละลายโดยทำที่อุณหภูมิห้อง และ 4 ^{o} ซ เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราส่วนโมล เติม 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล) คาร์โบไดอิมีด ไฮโดรคลอไรด์ 4.00 มก. (2.09×10^{-5} โมล) ในน้ำกลั่น 0.5 มล. ปรับพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 9-10 ด้วย 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ 1 คืน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี ต่อไป
* จากฝ่ายปฏิบัติการด้านกัมมันตภาพรังสี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

ผลของปริมาณโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินต่อค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน

โดยเตรียมเช่นเดียวกับวิธีข้างต้นแต่ใช้ปริมาณโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินต่าง ๆ กัน คือ 25.00, 15.00, 9.00, 5.00 และ 0.80 มก. (3.65, 21.9, 1.31, 0.73 และ 0.117×10^{-7} โมล ตามลำดับ) ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ 1 คืน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี ต่อไป

ผลของพีเอชต่อค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน

ใช้วิธีเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1.1 แต่ปรับพีเอชของสารละลายต่าง ๆ กัน เริ่มจาก 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 และ 10.5 ด้วย 0.5 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก ในช่วงพีเอชน้อยกว่า 9 และ 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ตั้งแต่พีเอช 9 ขึ้นไป ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ 1 คืน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี ต่อไป

2.4.1.2 สังเคราะห์ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (Doleschall และคณะ, 1963)

ละลายฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน 0.50 มก. (0.07×10^{-7} โมล) ในน้ำกลั่น 0.5 มล. แล้วละลาย 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอมิโนโพรพิล) คาร์โบไดอิมีด ไฮโดรคลอไรด์ 5.00 มก. (2.61×10^{-5} โมล) ในน้ำกลั่น 1.0 มล. เมื่อสารละลายทั้งสองละลายแล้วให้แช่ในอุณหภูมิ 4 ^{o} ซ และอุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อค่าอัตราส่วนโมล ผสมสารละลาย1-เอทิล-3-(3-ได

เมทิลอมิโนโพรพิล)คาร์โบไดอิมีดไฮโดรคลอไรด์ 0.6 มล. ลงในสารละลายฮิวแมนซีรัม อัลบูมิน โดยผสมสารละลายด้วยเครื่องผสมสารตลอดเวลา ละลายธัยรอกซิน 20.00 มก. (2.57×10^{-5} โมล) ในตัวทำละลาย (ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ : น้ำกลั่น 1:1 โดยปริมาตร) 0.5 มล. ผสมกับสารกัมมันตภาพรังสีธัยรอกซิน ไอโอดีน-125 จำนวน 5 ไมโครลิตร (100,000-150,000 cpm) แล้วค่อย ๆ เติมลงในสารละลายผสมข้างต้นพร้อมเขย่าด้วยเครื่องผสมสารตลอดเวลา เติมสารละลายที่เหลืออีก 0.4 มล. ของ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอมิโนโพรพิล) คาร์โบไดอิมีด ไฮโดรคลอไรด์ ปรับพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 9-10 ด้วย 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผสมสารละลายดังกล่าวต่ออีกประมาณ 5 นาที ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ 1 คืน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจล ฟิล เตรชัน โครมาโตกราฟี ต่อไป

ผลของปริมาณฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินต่อค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน

โดยเตรียมเช่นเดียวกับวิธีข้างต้นแต่ใช้ปริมาณโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินต่าง ๆ กัน คือ 200.00, 80.00, 33.00, 1.50 และ 0.50 มก. ($29.20, 11.68, 4.82, 0.22$ และ 0.07×10^{-7} โมล ตามลำดับ) ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ 1 คืน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี ต่อไป

ผลของพีเอชต่อค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน

ใช้วิธีเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1.1 แต่ปรับพีเอชของสารละลายต่าง ๆ กัน เริ่มจาก 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 และ 10.5 ด้วย 0.5 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก (ในช่วงพีเอชน้อยกว่า 9) และ 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (พีเอช 9 ขึ้นไป) ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ 1 คืน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี ต่อไป

2.4.1.3 สังเคราะห์ธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน (Chopra และคณะ, 1971 : Haber และคณะ, 1965 : Stasom และคณะ, 1967)

ละลายธัยรอกซิน 1.074 กรัม. (1.38×10^{-3} โมล) ในตัวทำละลาย(ไพริดีน : น้ำกลั่น1:1 โดยปริมาตร) 20 มล. กวนตลอดเวลา ผสมสารกัมมันตภาพรังสีธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 จำนวน 5 ไมโครลิตร (100,000-150,000 cpm) ตามลงไป ละลายโพลี-ดี-ไลซีน 0.200 กรัม (8.36×10^{-7} โมล) ในตัวทำละลายข้างต้น 20 มล.ผสมตามลงไปโดยค่อย ๆ หยดและกวนตลอดเวลา เติมสารละลาย1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอมิโนโพรพิล) คาร์โบไดอิมีด ไฮโดรคลอไรด์ 2.00 กรัม (1×10^{-2} โมล) ในตัวทำละลาย 20 มล. ตามลงไปโดยเติมช้า ๆ และกวนตลอดเวลาเพื่อกันการเกิดตะกอน จากนั้นตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ เป็นเวลา 1 คืน เพื่อเก็บไว้ทำไดอะไลซีสต่อไป ระหว่างนี้สารละลายจะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง

2.4.2 การทำอิมมูโนเจนให้บริสุทธิ์

2.4.2.1 การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีไดอะไลซีส (Ferrua และคณะ, 1986)

นำสารที่เตรียมได้ทั้งหมดบรรจุลงในถุงไดอะไลซีส (dialysis bag) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.9 มม.MW cutoff 20,000 ดาลตัน แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.9 % น้ำหนักต่อปริมาตร) 4 ลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 5 ลิตร พร้อมกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเพื่อกำจัดตะกอนที่เกิดขึ้นทิ้งแล้วนำสารที่ได้ไปแช่แข็งเพื่อนำไปทำแห้งเพื่อเตรียมเป็นอิมมูโนเจนใช้ในการฉีดต่อไป

2.4.2.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี (Granath และคณะ, 1967 : Haber และคณะ, 1965 : Burke และคณะ, 1975)

การเตรียมคอลัมน์ Sephadex-G-25

ชั่งผงเจล Sephadex G-25 8.00 กรัม แช่ในน้ำกลั่นและนำไปอุ่นที่ 90 ^{o} ซ ประมาณ 1 ชม. ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กวนให้เข้ากันแล้วค่อย ๆ บรรจุเจลลงในคอลัมน์ซึ่งมีขนาดความสูง 30 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. ล้างด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ แอมโมเนียมไบคาร์บอเนตอย่างน้อยหนึ่งเท่าของปริมาตรคอลัมน์ (50 มล.)

การทำอิมมูโนเจนให้บริสุทธิ์

นำสารที่เตรียมได้หลังจากทิ้งไว้ 1 คืน 1.5 มล.(หัวข้อ 2.4.1.1 และ 2.4.1.2) ผ่านลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ชะด้วยสารละลาย 0.1โมลาร์ แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต เก็บสารที่ผ่านจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บสาร (fraction collector) ลงในหลอดแก้วหลอดละ 1 มล. ประมาณ 30 หลอด

การทำอิเล็กโตรฟอเรซีส (Laemmli, 1970)

นำส่วนแรกและส่วนที่ 2 จากการแยกสารโดยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีมาทำอิเล็กโตรฟอเรซีสเพื่อยืนยันว่าส่วนแรกจากการแยกมีอัลบูมินในสารที่สนใจและส่วนหลังคือธัยรอกซินที่ไม่เกิดการรวมกับอัลบูมินเมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

เติมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกัน เริ่มจาก สารละลาย 30 % อะคริลเอมีด-0.8 % บิส-อะคริลเอมีด (30 % acrylamide-0.8 % bis-acrylamide solution) 2.3 มล. 3 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 8.5 1.75 มล. (3 M Tris-HCl) 1% เอสดีเอส (sodium dodecylsulphate, SDS) 0.7 มล. 1.5% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต พีเอช 6.8 0.35 มล. เตตราเอทิล เมทิลีน ไดเอมีน (tetraethyl methylene diamine) 10 ไมโครลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 1.9 มล. เขย่าให้เข้ากันเทลงในกรอบแก้วที่เตรียมไว้ เมื่อเจลเริ่มแข็งตัวให้เติมสารละลายชั้นที่ 2 ดังต่อไปนี้ ผสมสารละลาย 30 % อะคริลเอมีด-0.8 %บิส-อะคริลเอมีด 0.5 มล. สารละลาย 1% เอสดีเอส 0.4 มล. สารละลาย 0.5 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 1 มล. สารละลาย 1.5 % แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต 0.2 มล. เตตราเอทิล เมทิลีน ไดเอมีน 5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 1.9 มล. ผสมให้เข้ากันเทลงบนชั้นที่ 1 ในกรอบแก้วที่เตรียมไว้ นำหวี (comb) วางลงในกรอบแก้วนี้เพื่อทำช่อง (well) ใส่สารตัวอย่าง

เติมบัฟเฟอร์ (running buffer)* สำหรับแยกในอุปกรณ์เจลอิเล็กโตรฟอเรซีสที่เตรียมไว้ ดึงหวีออก เติมสารตัวอย่าง (sample)*10 ไมโครลิตร และ โปรตีนมาตรฐาน (standard protein)* 10 ไมโครลิตร ลงในช่องที่เตรียมไว้ ใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ ในการแยกโดยทิ้งไว้จนสีของบรอมฟีนอล บลูจากบัฟเฟอร์ (sample buffer) ที่ใช้ในสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานขึ้นมา 2 ใน 3 ส่วนของขนาดเจล หลังการแยกแล้วย้อมสีเจลด้วยสีย้อม (staining solution)* โดยเขย่าประมาณ 1 ชม. จากนั้นนำมาล้างสีออกด้วย destaining solution* ประมาณ 3-4 ครั้ง ๆ ละประมาณ 30 นาที เมื่อล้างจนเห็นแถบในเจลชัดเจนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผล (* ดูรายละเอียดในภาคผนวก)

2.4.3 <u>การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอิมมูโนเจนที่เตรียมได้</u>

นำสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปวัดค่าอัตรานับวัด (count rate) ด้วยเครื่องนับจำนวนรังสีแกมมา (Gamma counter) ตามด้วยการวัดค่าการดูดกลืน (absorbance) สำหรับธัยรอกซินที่ 326 นาโนเมตร อัลบูมิน (โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน และ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน)ที่ 280 นาโนเมตร และ โพลี-ดี-ไลซีนที่ 222 นาโนเมตร

2.4.4 <u>การเก็บอิมมูโนเจน (Storage)</u>

เมื่อผ่านขั้นตอนการแยกสารให้บริสุทธิ์แล้วนำสารที่ได้ไปแช่แข็ง (freeze) แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องทำแห้ง (Freeze Dryer) 8-10 ชม. จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o} ซ โดยปิดด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) และเก็บรวมกับสารดูดความชื้น

2.4.5 <u>การฉีดในสัตว์ทดลอง (Immunization)</u>

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White เป็นสัตว์ทดลอง โดยช่วงแรกเป็นการเปรียบเทียบปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้ โดยแบ่งกระต่ายออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว กลุ่มแรกใช้ 1 มก. สำหรับการฉีดครั้งแรก (primary injection) แต่ในครั้งต่อ ๆ ไป (booster dose) ใช้เพียง 0.2 มก. กลุ่มที่ 2 ใช้อิมมูโนเจน 1 มก.ในการฉีดเท่ากันทุกครั้ง ทั้ง 2 กลุ่มมีช่วงเวลาในการฉีดและเจาะเลือดเท่ากัน คือ ทุก ๆ 2 สัปดาห์ (ดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้ฉีดในสัตว์ทดลอง

กลุ่มที่	จำนวน (ตัว)	ปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้ฉีด (มก.)	
		ครั้งแรก	ครั้งต่อมา
1	4	1.0	0.2
2	4	1.0	1.0

เมื่อได้ปริมาณอิมมูโนเจนที่เหมาะสมในการฉีดแล้ว จึงนำไปทดลองกับอิมมูโนเจนที่เตรียมได้ โดยสำหรับอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน แบ่งกระต่ายออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัวกลุ่มแรกใช้อิมมูโนเจนที่มีอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน < 10:1 กลุ่มที่ 2 ใช้ค่าอัตราส่วน > 10 < 20:1 กลุ่มที่ 3 ใช้ค่า > 20:1 อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกใช้อัตราส่วนโมล < 10:1 กลุ่มที่ 2 ใช้ค่า > 10 < 20:1 ในการกระตุ้นสัตว์ทดลอง ส่วนอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีนมีค่าอัตราส่วนโมลเพียงค่าเดียวจึงใช้กระต่ายเพียง 8 ตัว (แสดงดังตารางที่ 4) โดยฉีดเข้าที่ subcutaneous ที่บริเวณหลังของกระต่าย ในการฉีดแต่ละครั้งจะฉีดประมาณ 10-15 ตำแหน่ง เพื่อให้มีการกระจายตัวของอิมมูโนเจนได้ดี ซึ่งการเตรียมอิมมูโนเจนสำหรับการฉีดครั้งแรกทำได้โดย ชั่งอิมมูโนเจน 1 มก./ตัว ละลายในสารละลาย 0.9 % น้ำหนักต่อปริมาตร โซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 0.2 มล. รวมกับฟรอยด์แอดจูแวนต์ชนิดสมบูรณ์ (Complete Freund's Adjuvant) แล้วผสมให้เข้ากันจนเป็นอิมัลชัน (emulsion) กับสารละลายของอิมมูโนเจน

ตารางที่ 4 แสดงการแบ่งกลุ่มกระต่ายที่ใช้อิมมูโนเจนค่าอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กัน

จำนวนกระต่าย (ตัว)					
T4-BSA			T4-HSA		T4-PL
< 10 : 1	> 10 < 20:1	> 20 : 1	< 10 : 1	> 10 < 20:1	200 : 1
8	8	8	8	8	8

หมายเหตุ T4-BSA คือ ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน
T4-HSA คือ ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน
T4-PL คือ ธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน

ส่วนในการฉีดครั้งต่อ ๆ มา ใช้อัตราส่วนของ 0.9% โซเดียมคลอไรด์ต่อฟรอยด์แอดจูแวนต์เป็น 1 : 2 เช่นกัน ต่างกันที่ใช้อิมมูโนเจนเพียง 0.2 มก./ตัว และใช้ฟรอยด์ แอดจูแวนต์ชนิดไม่สมบูรณ์ (Incomplete Freund's Adjuvant)

สำหรับการเจาะเลือดตรวจการตอบสนองในกระต่ายจะทำการเจาะทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยเจาะที่บริเวณใบหูของกระต่าย (เก็บเลือดครั้งละ 2-3 มล.) เมื่อได้เลือดมาแล้วตั้งทิ้งไว้จนซีรัมแยกจากเม็ดเลือดชัดเจนจึงนำไปปั่นให้ได้เฉพาะซีรัมมาทดสอบ

2.4.6 <u>การทดสอบคุณภาพแอนติซีรัมที่ผลิตได้</u>

การทดสอบแบ่งเป็น 3 ลักษณะ คือ

2.4.6.1 ทดสอบหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม

นำแอนติซีรัมมาเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์* ในอัตราส่วนต่าง ๆ เช่น 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 และ 1:400 เป็นต้น โดยเริ่มจากนำแอนติซีรัม 50 ไมโครลิตร รวมกับ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 450 ไมโครลิตร จะได้อัตราส่วนการเจือจาง 1:10 นำสารละลายอัตราส่วน 1:10 50 ไมโครลิตร รวมกับ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 450 ไมโครลิตร จะได้อัตราส่วนการเจือจาง 1:50 นำสารละลายอัตราส่วน 1:10 100 ไมโครลิตร รวมกับ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 900 ไมโครลิตร จะได้อัตราส่วนการเจือจาง 1:100 นำสารละลายอัตราส่วน 1:100 500 ไมโครลิตร รวมกับ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร จะได้อัตราส่วนการเจือจาง 1:200 นำสารละลายอัตราส่วน 1:200 500 ไมโครลิตร รวมกับ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร จะได้อัตราส่วนการเจือจาง 1:400

*ดูรายละเอียดในภาคผนวก

จากนั้นนำหลอดทดลองมาเติมสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้โดยทุกหลอดจะทำเป็นคู่ (duplicate) เริ่มจากหลอด Tc (total count) ซึ่งเติมเฉพาะธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร, หลอด NSB (non-specific binding) เติมฮอร์โมน ฟรี ซีรัม (hormone free serum)(ดูรายละเอียดในภาคผนวก) หลอดละ 25 ไมโครลิตร ตามด้วยธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร และ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ หลอดละ 200 ไมโครลิตร , หลอด STD_0 เติมฮอร์โมน ฟรี ซีรัม หลอดละ 25 ไมโครลิตร ตามด้วยแอนติซีรัมที่ได้เจือจางไว้แล้วหลอดละ 50 ไมโครลิตร โดยแต่ละค่าอัตราส่วนการเจือจางจะแยกเติมในหลอดทดลองแต่ละคู่ตามด้วย ธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร และ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ หลอดละ 200 ไมโครลิตร , หลอด STD_{max} เติมธัยรอกซินมาตรฐาน 350 นาโนโมลาร์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) หลอดละ 25 ไมโครลิตร ตามด้วยแอนติซีรัมที่ได้เจือจางไว้แล้วหลอดละ 50 ไมโครลิตร โดยแต่ละค่าอัตราส่วนการเจือจางจะแยกเติมในหลอดทดลองแต่ละคู่ตามด้วย ธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร และ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ หลอดละ 200 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองทุกหลอดข้างต้น (ยกเว้นหลอด Tc) ไปผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลาเติมแอนติบอดีตัวที่ 2 (2nd Ab)* ลงไปหลอดละ 500 ไมโครลิตร (ยกเว้นหลอด Tc) ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก 40 นาที 4 ^{o} ซ ด้วยความเร็ว 3,000

รอบต่อนาที (ยกเว้นหลอด Tc) จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง (decant) นำไปวัดค่าอัตรานับวัดและเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % B/T และอัตราส่วนการเจือจางที่เติมลงไป

* จากฝ่ายปฏิบัติการด้านกัมมันตภาพรังสี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

2.4.6.2 ทดสอบหาค่าคงที่สัมพรรคภาพ (affinity constant, K_a)

นำแอนติซีรัมที่ทราบค่าไตเตอร์แล้วมาเจือจางในอัตราส่วนนั้นแล้วทำต่อดังนี้ โดยทุกหลอดทำเป็นคู่เช่นเดียวกับการหาค่าไตเตอร์ เริ่มจากหลอด Tc ซึ่งเติมเฉพาะธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร, หลอด NSB เติมฮอร์โมน ฟรี ซีรัม หลอดละ 25 ไมโครลิตร ตามด้วยธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร และ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ หลอดละ 200 ไมโครลิตร , หลอด STD_0 เติมฮอร์โมน ฟรี ซีรัม หลอดละ 25 ไมโครลิตร ตามด้วยแอนติซีรัมที่เจือจาง (ทราบค่าไตเตอร์แล้ว) หลอดละ 50 ไมโครลิตร , หลอดSTD_{1-5} เติมธัยรอกซินมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ เริ่มจาก 1.15, 3.04, 6.42, 10.34 และ 17.44 ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร โดยแต่ละค่าความเข้มข้นของธัยรอกซินจะแยกเติมในหลอดทดลองแต่ละคู่ตามด้วยแอนติซีรัมที่ทราบค่าไตเตอร์แล้วหลอดละ 50 ไมโครลิตร และ ธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร และ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ หลอดละ 200 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองทุกหลอดข้างต้น (ยกเว้นหลอด Tc) ไปผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม. ส่วนขั้นตอนอื่น ๆ ทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.4.6.1

จากนั้นนำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแอนติเจนที่รวมกับแอนติบอดีแล้ว (weight of bound antigen) และ bound fraction ความชันจากความสัมพันธ์ดังกล่าวก็คือค่าคงที่สัมพรรคภาพ (K_a) ซึ่งมีหน่วยต่อโมลาร์

2.4.6.3 ทดสอบปฏิกริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงธัยรอกซิน (Cross reaction test)

สารที่นำมาทดสอบและความเข้มข้นเริ่มต้นที่เตรียมแสดงดังตารางที่ 5 โดยเตรียมให้เป็นสารละลายก่อนนำไปเจือจาง เริ่มจากชั่งธัยรอกซิน (D-thyroxine) 5.00 มก. ละลายด้วย 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 มล. จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2.50 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2.50×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ชั่งแอล-ไตรไอโอโดธัยโรนีน (L-triiodothyronine) 4.20 มก. ละลายด้วย 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 มล. จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2.10 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2.10×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ชั่งดี-ไตรไอโอโดธัยโรนีน (D-triiodothyronine) 4.20 มก. ละลายด้วย 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 มล. จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2.10 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2.10×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ชั่งไตรไอโอโดธัยโรอะซิติก แอซิด (Triiodothyroacetic acid) 4.00 มก. ละลายด้วยเมทานอล/น้ำ (อัตราส่วน 1:1) 2 มล. จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2.00 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2.00×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ชั่งไตรไอโอโดโพรพิโอนิก แอซิด(Triiodopropionic acid) 4.10 มก. ละลายด้วยเอทานอล 2 มล.จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2.05 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ใน อัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2.05×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ชั่งไดไอโอโดธัยโรนีน (Diiodothyronine) 3.38 มก. ละลายด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก /เมทานอล (อัตราส่วน 1:1) 2 มล. จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.69 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1.69×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ชั่งไดไอโอโดไทโรซีน (Diiodotyrosine) 2.78 มก. ละลายด้วย 70 % เอทานอล/น้ำ (อัตราส่วน 1:1) 2 มล. จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.39 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1.39×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ชั่งโมโนไอโอโดไทโรซีน (Monoiodotyrosine) 1.98 มก. ละลายด้วยน้ำ 2 มล. จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.99 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.99×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ชั่งไทโรซีน (Tyrosine) 1.96 มก. ละลายด้วยน้ำ 2 มล. จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.58 มก. ต่อ มล. จากนั้นเจือจางด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 จากเริ่มต้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.58×10^3 ไมโครกรัม ต่อ มล.

ตารางที่ 5 แสดงสารประกอบที่ใช้ทดสอบปฏิกริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

สารประกอบ	ความเข้มข้นเริ่มต้น(มก./มล.)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ไมโครกรัม/มล.)
D-thyroxine	2.50×10^3	2.5×10^3
L-triiodothyronine	2.10×10^3	2.1×10^3
D-triiodothyronine	2.10×10^3	2.1×10^3
triiodothyroacetic acid	2.00×10^3	2.0×10^3
triiodopropionic acid	2.05×10^3	2.05×10^3
diiodothyronine	1.69×10^3	1.69×10^3
diiodotyrosine	1.39×10^3	1.39×10^3
monoiodotyrosine	0.99×10^3	0.99×10^3
tyrosine(DL)	0.58×10^3	0.58×10^3

ในการทดสอบจะใช้หลอดทดลองเป็นคู่เช่นเดียวกับขั้นตอนอื่น ๆ โดยเริ่มจากหลอด Tc ซึ่งเติมเฉพาะธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร, หลอด NSB เติมฮอร์โมน ฟรี ซีรัม หลอดละ 25 ไมโครลิตร ตามด้วยธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 หลอดละ 50 ไมโครลิตร และ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ หลอดละ 200 ไมโครลิตร , หลอดทดสอบสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 5 เริ่มโดยเติมสารที่ได้เจือจางไว้แล้วซึ่งมีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลอดละ 25 ไมโครลิตร ตามด้วยแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบซึ่งทราบค่าไตเตอร์แล้ว

ส่วนขั้นตอนอื่น ๆ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.4.6.1 แล้วนำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % B/T กับปริมาณสารประกอบข้างต้น

การพิจารณาปริมาณสารข้างต้นที่มีผลต่อการทดสอบจะพิจารณาที่ 50 % B/T เช่นกัน