บทที่ 2

วัสดุ เคมีภัณฑ์ ครุภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาว (Albino rat) พันธุ์ Charles Foster ของแผนกวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เคมีภัณฑ์

	เกรด	บริษัท
อาหารหนูสำเร็จ	–	F.E Zuelling
Acetaldehyde	Laboratory reagent	BDH
Acrylamide	–	Merck
Anesthetic Ether	Laboratory reagent	May & Baker
Ammoniumpersulfate	Laboratory reagent	May & Baker
Bis-acrylamide (N, N'-Methylenediacrylamide)	–	Merck
1, 4-Bis-(5-phenyl-2-Oxazolyl)-benzol (POPOP)	Scintillation	Fluka AG, Buchs SG
Bovine Serum Albumin (BSA)	Crystallized	Sigma
Bromophenol blue	Laboratory reagent	BDH
Comassie Brilliant Blue R 250	Electrophoresis	BDH

	เกรด	บริษัท
Cyanogum 41	Laboratory reagent	BDH
Cycloheximide	Laboratory reagent	Koch-Light Laboratory Ltd.
Deoxyribonucleic acid, sodium salt from Calf Thymus	Highly polymerized	BDH
Dimethylsulfoxide	Laboratory reagent	Merck
Diphenylamine	Laboratory reagent	BDH
2, 5-Diphenyloxazole (PPO)	Scintillation	Sigma
Ficoll	Laboratory reagent	BDH
Glycerol	Laboratory reagent	BDH
Hardeners' Type	Laboratory reagent	May & Baker
Kodak No-Screen Film NS-2T	-	Kodak
Mercaptoethanol	-	Merck
L- 4, 5 -^{3}H Leucine (53 Ci/m mole aqueous solution containing 2% ethanol)	-	The Radiochemical Centre, Amersham, England
L- -U-^{14}C Leucine (343 mCi/m mole aqueous solution containing 2% ethanol)	-	The Radiochemical Centre, Amersham, England
Orcinol	Laboratory reagent	BDH
Phenol reagent (Folin-Ciocatteu reagent)	เตรียมในห้องปฏิบัติการแผนกวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	เกรด	บริษัท
Polycon'A solution 1	Laboratory reagent	May & Baker
Polycon'A solution 2	Laboratory reagent	May & Baker
Ribonucleic acid (yeast)	-	Sigma
Sodium dodecylsulfate	Anhydrous	Sigma
Super Amfix A	Laboratory reagent	May & Baker
N, N, N', N'-Tetramethylenediamine (TEMED)	Laboratory reagent	BDH
Trypan blue	Laboratory reagent	May & Baker
Toluene	Laboratory reagent	J.T. Baker
Triton X-100	Laboratory reagent	BDH

2.3 กรุภัณฑ์

เครื่องมือ	บริษัท
Autoclave	Griffin
Electrophoretic Apparatus Model DE 102	Hofer Scientific Instuments
Freeze-drier	Edward
High Vacuum Pump Model ISC 50 B	Edwards High Vacuum Ltd.
Microscopics Model E	Olympus
Millipore Filter	Millipore
Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Model 3390	Packard
pH meter Model 28	Radiometer Copenhagen

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือ	บริษัท
Spectronic 20	Bausch & Lomb
Spectrophotometer Model 25	Beckman
Super-minor centrifuge	MSE

003616

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 วิธีดำเนินการทดลอง

2.4.1 สัตว์ทดลอง

2.4.1.1 การเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง

เลี้ยงหนูขาวพันธุ์ Charles Foster ในห้องทดลองของแผนกวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และเลี้ยงด้วยอาหารสำหรับหนูทดลองของบริษัท F.E. Zuelling (Gold Coil Mills) โดยมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลา หนูที่ใช้ทำการทดลองเป็นเพศเมียที่ให้หย่านมตั้งแต่อายุ 30 วันและเลี้ยงต่อมาด้วยอาหารหนูจนมีอายุประมาณ 2 – 3 เดือน มีน้ำหนักเฉลี่ย 200–250 กรัม

2.4.1.2 การตรวจวงจรสืบพันธุ์ (Estrous cycle) ของหนูทดลอง (Long และ Evan , 1922)

เราอาจศึกษาวงจรสืบพันธุ์ได้โดยการตรวจดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลบุช่องคลอด (epithelial lining ของ vagina) ในระยะต่าง ๆ ของ vagina cycle โดยวิธี vagina smear เวลา 8.00–9.00 น. วิธีการคือ จับหนูเพศเมียหงายท้องดูบริเวณเม็ดละมุด (clitoris) และช่องทวารหนัก ถ้าช่องคลอดเปิดจะพบช่องระหว่างเม็ดละมุดกับช่องทวารหนัก เอาหลอดหยดดูด 0.85% โซเดียมคลอไรด์เข้าไปแล้วดูดกลับ นำเอาของเหลวที่ได้นี้ไปหยดลงบนแผ่นแก้ว (slide) ที่สะอาดแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 10 x 10 เราจะเห็นเซลรูปต่าง ๆ กันเปลี่ยนแปลงไปตามระยะวงจรสืบพันธุ์ของหนูทดลอง ซึ่งเราสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะคือ

ก. ระยะโปรเอสตรัส (Proestrous)

เป็นระยะก่อนที่จะมีการตกไข่ ฟอลลิเคิล (follicle) ภายในรังไข่จะเจริญเต็มที่ และเตรียมพร้อมที่จะตกไข่ รังไข่มีการสังเคราะห์เอสโตรเจนจำนวนมากและจะพองน้ำ มีเส้นเลือดไปหล่อเลี้ยงมาก epithelial cell ที่

ผนังช่องคลอดจะมีการแบ่งเซลทำให้ผนังช่องคลอดหนาขึ้น เซลที่ตรวจพบในระยะนี้มีลักษณะค่อนข้างกลม มีนิวเคลียสเห็นได้ชัดเจนเรียกว่า" nucleated cells " และเราจะไม่พบเซลเม็ดเลือดขาวในระยะโปรเอสตรัสเลย ระยะนี้กินเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง (รูปที่ 3)

ข. ระยะเอสตรัส (Estrous)

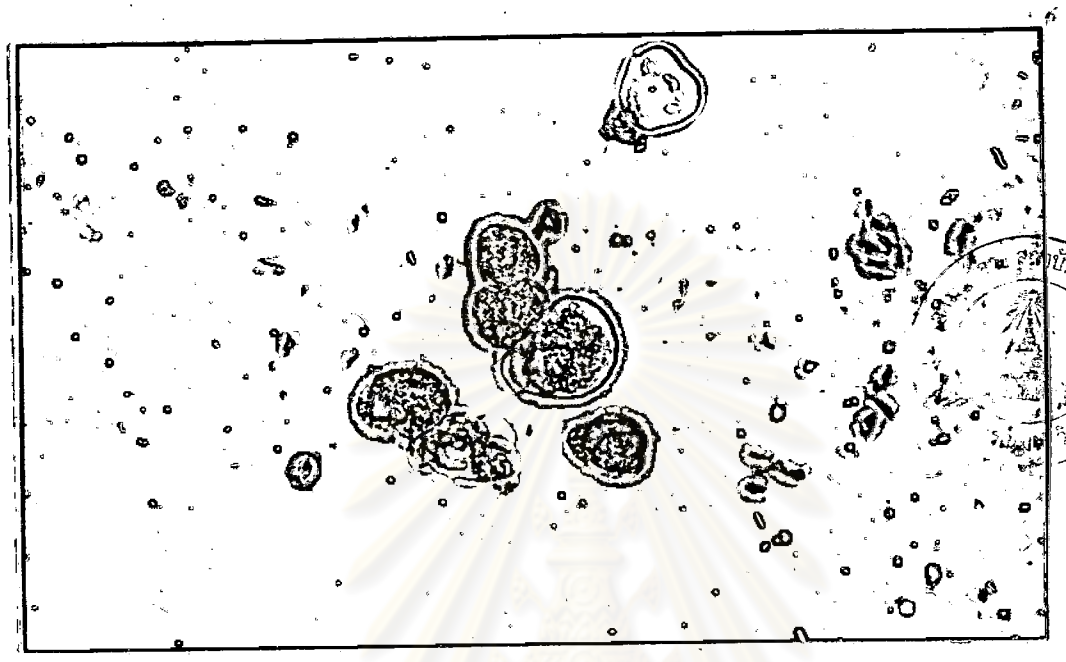
หนูทดลองจะมีระดับเอสโตรเจนในเลือดสูงและจะมีการตกไข่ในตอนต้นระยะนี้ หลังจากนั้นระดับเอสโตรเจนจะลดลงและมดลูกจะมีขนาดเล็กลง เนื่องจากมีการสูญเสียน้ำโดยการขับออกไปในโพรงมดลูก ดังนั้นระยะนี้จะมีของเหลวในโพรงมดลูกมากที่สุด เราจึงใช้ระยะนี้เป็นระยะเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกเพื่อนำไปศึกษาต่อไป ในระยะนี้ผนังช่องคลอดยังคงหนาและในที่สุดฟอลลิเคิลจะแตก ลักษณะของเซลที่สังเกตเห็นจากกล้องจุลทัศน์ในระยะนี้จะเป็นรูปเหลี่ยม ๆ เรียกว่า "conified cells" เป็นเซลที่มีขนาดใหญ่แต่มองไม่เห็นนิวเคลียสตอนท้าย ๆ ระยะนี้จะมีเซลเม็ดเลือดขาวปะปนอยู่บ้างเล็กน้อย ระยะนี้กินเวลา 9 ถึง 12 ชั่วโมง (รูปที่ 4)

ค. ระยะเมทเอสตรัส Metestrous)

ระยะนี้หนูทดลองจะมีระดับเอสโตรเจนในเลือดต่ำ ภายในรังไข่จะตรวจพบคอร์โปรา ลูเทีย(corpora lutea) และฟอลลิเคิลเล็ก ๆ เป็นจำนวนมาก มดลูกมีขนาดเล็ก เซลที่ตรวจพบในช่องคลอดระยะนี้จะมีเม็ดเลือดขาวเป็นจำนวนมากปะปนอยู่กับ cornified cells ระยะนี้เป็นระยะสั้น ๆ เพียงประมาณ 6 ชั่วโมง (รูปที่ 5)

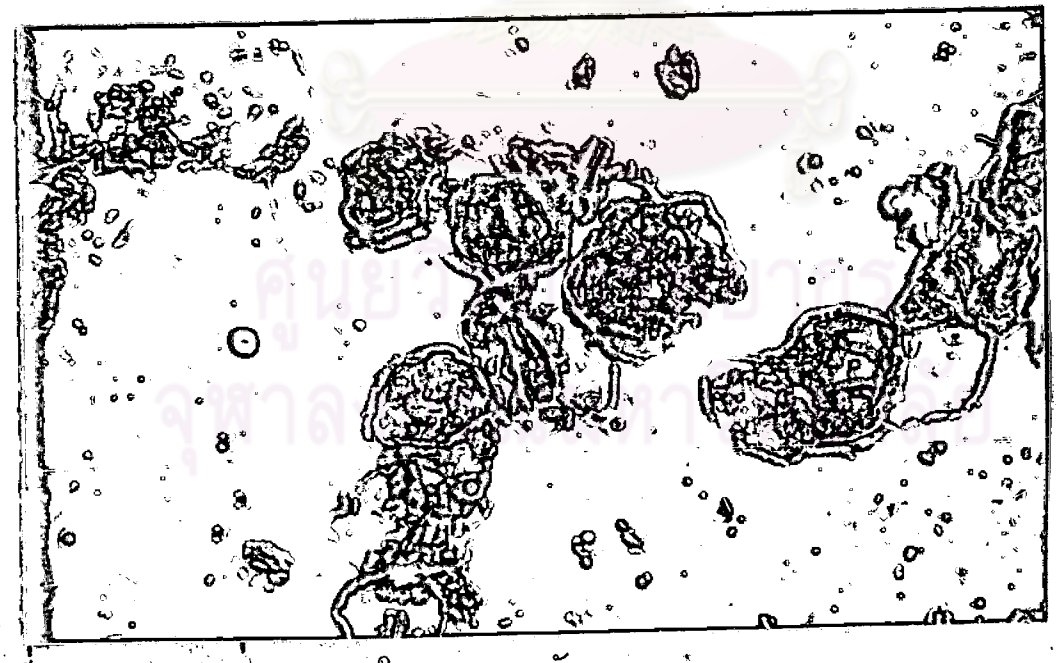
ง. ระยะไดเอสตรัส (Diestrous)

ในระยะนี้รังไข่จะไม่มีการผลิตเอสโตรเจนเลย และคอร์โปรา ลูเทียเริ่มสลายตัว มดลูกมีขนาดเล็ก ผนังช่องคลอดจะบางกว่าระยะอื่น ๆ เมื่อตรวจวงจรสืบพันธุ์จะพบแต่เซลเม็ดเลือดขาว ระยะนี้กินเวลาประมาณ 60 ถึง 70 ชั่วโมง (รูปที่ 6)



รูปที่3 ภาพแสดงรูปร่างของเซลในระยะโปรเอสตรัส

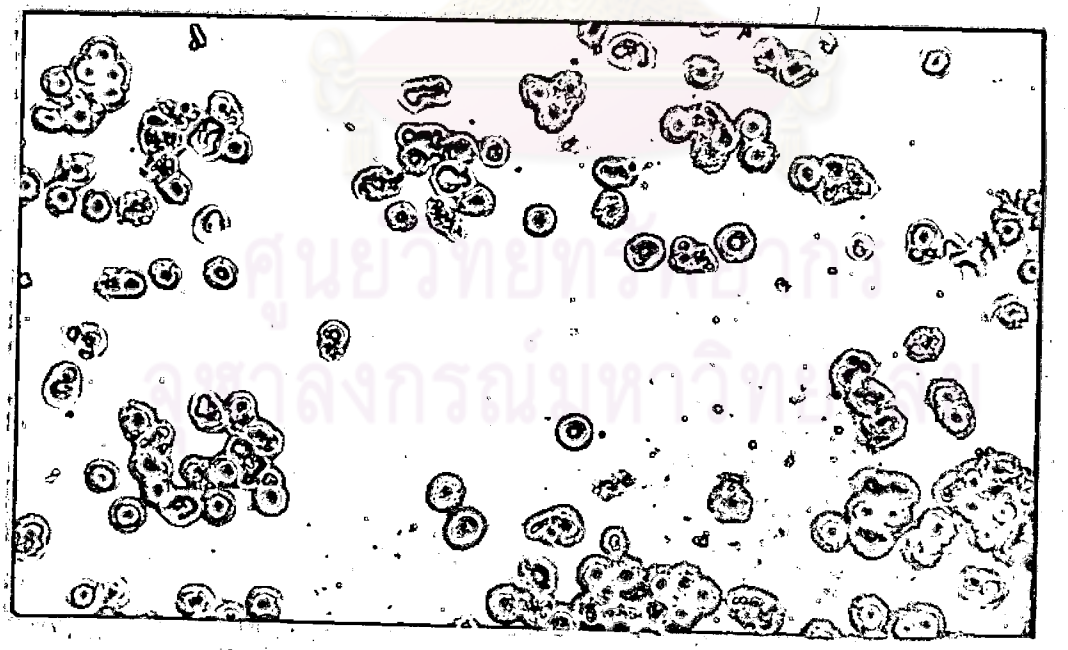
(ถ่ายภาพด้วยระบบ phase contrast กำลังขยาย 10 x 40)



รูปที่4 ภาพแสดงรูปร่างของเซลในระยะเอสตรัส

(ถ่ายภาพด้วยระบบphase contrast กำลังขยาย 10 x 40)

รูปที่ 5 ภาพแสดงรูปรางของเซลในระยะเมทเอสตรัส
(ถายภาพดวยระบบ phase contrast กำลังขยาย 10 x 40



รูปที่ 6 ภาพแสดงรูปรางของเซลในระยะไดเอสตรัส
(ถายภาพดวยระบบphase contrast กำลังขยาย 10 x 40)

2.4.1.3 การเจริญเติบโตของหนูเพศเมียในสภาพปกติ

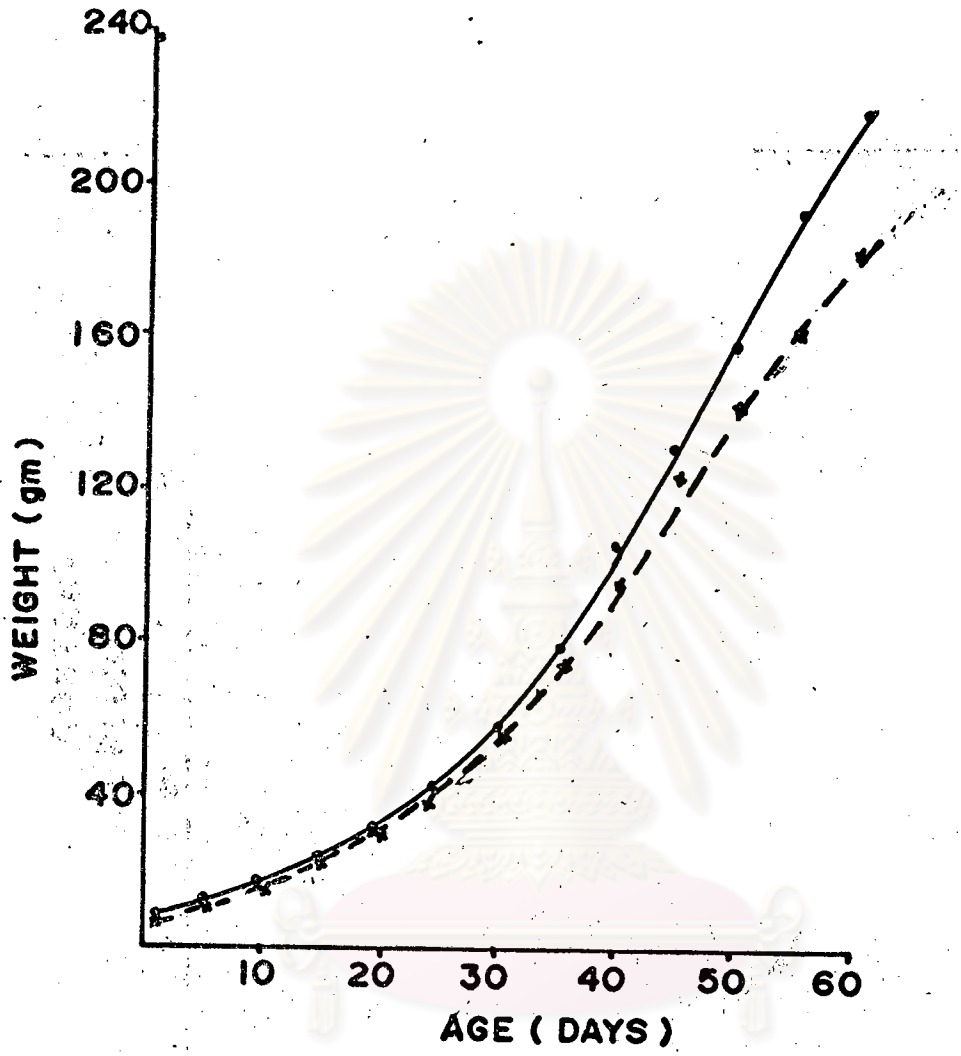
นำหนูทดลองไปชั่งน้ำหนักตั้งแต่วันแรกเกิดจนถึงระยะ 2 เดือน โดยแยกชั่งเพศผู้และเพศเมียในแต่ละครอก(ประมาณ 8 ตัว) แล้วนำไปหาน้ำหนักเฉลี่ย ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 7

2.4.1.4 การผ่าตัดใส่ห่วงคุมกำเนิดให้แก่หนูทดลอง

ทำตามวิธีของ Doyle และ Margolis (Doyleและ Margolis, 1963) ในการผ่าตัดใส่ห่วงคุมกำเนิดโดยเลือกใช้หนูทดลองที่อยู่ในระยะเอสตรัสเวลา9.00-10.00 น. เนื่องจากสังเกตเห็นมดลูกที่จะใส่ห่วงคุมกำเนิดได้ง่าย เพราะมีของเหลว(uterine fluid) สะสมอยู่มากโดยเห็นเป็นลักษณะกระเปาะยาว ๆ นอกจากนี้ยังใส่ห่วงคุมกำเนิดได้สะดวกด้วย

วางยาสลบหนูโดยให้คมอีเทอร์ในขวดโหลแก้ว แล้วนำหนูไปวางบนแท่นผ่าตัดและใช้เส้นยางขึงขาทั้งสี่ข้างในลักษณะหนูนอนหงายท้อง ผ่าตัดเปิดหน้าท้องเป็นช่องยาวประมาณ 1 ถึง 1.25 เซ็นติเมตร แล้วค่อย ๆ ดึงเอาไขมันที่ติดกับมดลูกออกมาซึ่งจะพาเอามดลูกหนูออกมาด้วยทั้งสองปีก ค่อย ๆ วางปีกมดลูกลงบนผ้า gauze ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคเรียบร้อยแล้ว ใช้ผ้า gauze ชิ้นเล็ก ๆ ชุบ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ทาที่มดลูกเพื่อป้องกันมิให้มดลูกแห้ง จากนั้นใช้เข็มที่ร้อยไหมผ่าตัดสอดเข้าไประหว่างโพรงของปีกมดลูกด้านขวา ร้อยเป็นระยะทางประมาณ 1 เซ็นติเมตร แล้วผูกไหมผ่าตัดให้เป็นรูปห่วง (loop)ยาวประมาณ 5-6 เซ็นติเมตรคาไว้กับปีกมดลูกด้านขวาดังแสดงในรูปที่ 8 ส่วนมดลูกด้านซ้ายทำ"sham" โดยการสอดเข็มที่มีไหมผ่าตัดผ่านโพรงมดลูกเท่านั้น หลังจากนั้นเก็บมดลูกคืนสู่ช่องท้องแล้วเย็บปิดหน้าท้องโดยแบ่งการเย็บเป็น 2 ชั้นคือ ชั้นที่เป็นกล้ามเนื้อเย็บด้วยเอ็นขนาด 5/0 ส่วนชั้นที่เป็นผิวหนังเย็บด้วยไหมผ่าตัด ปล่อยให้หนูพักฟื้นประมาณ 10-15 วันก่อนที่จะทำการทดลองผ่าตัดเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกหนูเพื่อศึกษาต่อไป

อนึ่งเครื่องมือทุกชิ้นที่ใช้ในการผ่าตัดนี้จะผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วทั้งสิ้น เพื่อป้องกันการติดเชื้อให้มากที่สุดที่จะกระทำได้

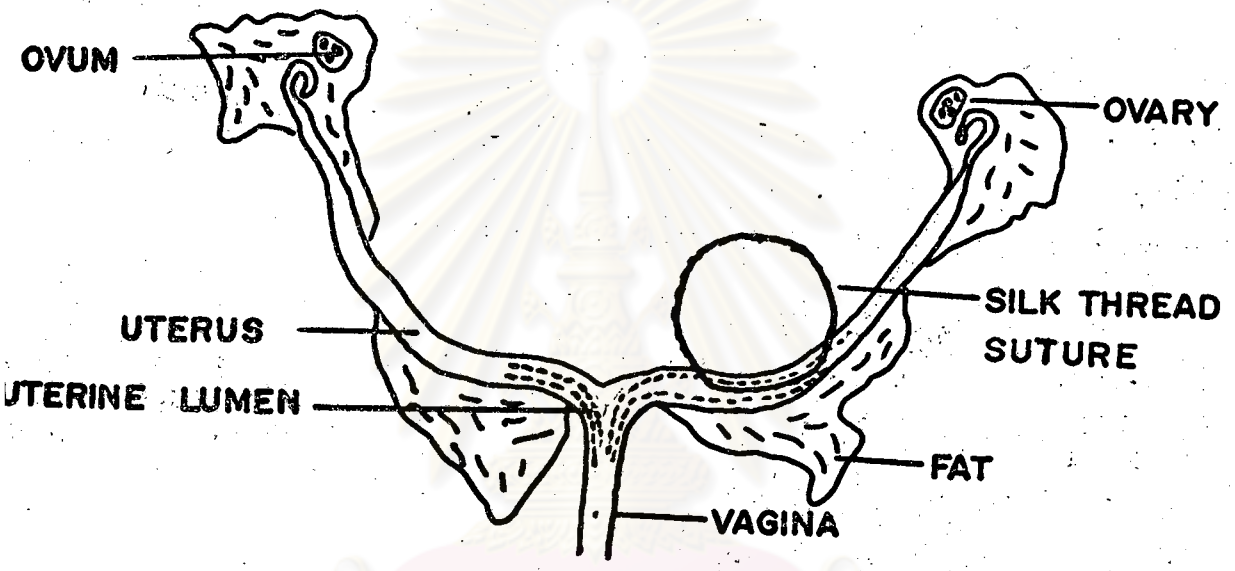


รูปที่ 7 การเจริญเติบโตโดยน้ำหนักของหนูเพศผู้และเพศเมียปกติ

——●—— หนูเพศผู้

*- - - - * หนูเพศเมีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 แผนภาพแสดงมดลูกหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.1.5 การเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลอง

เก็บของเหลวจากโพรงมดลูก (uterine fluid) จากหนูที่อยู่ในระยะเอสตรัสโดยการผ่าตัดเปิดหน้าท้องตามวิธีที่อธิบายในข้อ2.4.1.4 แล้วใช้เข็มฉีดยาขนาดหมายเลข25 ดูดเอาของเหลวจากโพรงมดลูกไปทำการศึกษาต่อไป หลังจากนั้นจึงเย็บปิดหน้าท้องตามเดิม ของเหลวจากโพรงมดลูกที่ได้ในแต่ละครั้งมีจำนวนน้อยมากเพียงประมาณ 0.2 มิลลิลิตรเท่านั้น ในการศึกษาเพื่อทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของของเหลวนี้ต้องรวบรวม(pool) จากหนูหลายตัว หนูแต่ละตัวจะใช้ทำการทดลองเก็บของเหลวได้ประมาณ 4 ครั้ง โดยทิ้งระยะเวลาของการเก็บของเหลวอย่างน้อยที่สุด 10-15 วัน

2.4.1.6 การผ่าตัดถอดห่วงคุมกำเนิด

ในการผ่าตัดเพื่อถอดห่วงคุมกำเนิดออกนั้น ใช้หนูในระยะเอสตรัสมาผ่าตัดเปิดหน้าท้องด้วยวิธีที่อธิบายในข้อ 2.4.1.4 ตัดและดึงห่วงไหมออกจากมดลูกหนูทดลองแล้วจึงเย็บปิดหน้าท้อง ทิ้งให้หนูพักฟื้นประมาณ 10-15 วันก่อนที่จะนำไปผ่าตัดเพื่อเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกหรือทดสอบการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ต่อไป

2.4.1.7 การตรวจหนูตั้งท้องปกติ

ใช้วิธีตรวจทางช่องคลอด (vagina smear) เช่นเดียวกับที่ใช้ในการตรวจวงจรสืบพันธุ์ โดยนำหนูทดลองในระยะโปรเอสตรัสและเป็นหนูที่มีวงจรสืบพันธุ์ปกติต่อเนื่องกันอย่างน้อย 2 วงจรไปอยู่รวมกับหนูเพศผู้ 1 คืนแล้วนำหนูไปตรวจในวันรุ่งขึ้น ถ้าพบเชื้ออสุจิ (sperm) ในช่องคลอดก็นับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้อง

ถ้าเป็นหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด จะทิ้งระยะเวลาหลังการผ่าตัดใส่ห่วงคุมกำเนิดนานประมาณ 2 วงจรสืบพันธุ์ก่อนที่จะนำไปผสมกับเพศผู้ การพบเชื้ออสุจิในช่องคลอดนับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้องเช่นเดียวกัน

2.4.1.8 การเหนี่ยวนำให้หนูท้องเทียม (Pseudopregnancy)

นำหนูทดลองในระยะโปรเอสตรัสมาจี้ช่องคลอดด้วยกระแสไฟฟ้าความถี่ 32 รอบต่อวินาที 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที เมื่อถึงระยะเอสตรัสนำหนูไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าอีกด้วยวิธีเดียวกันและถือเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้องเทียม ถ้าเราตรวจดูช่องคลอดจะพบว่า ภายในช่องคลอดมีแต่เซลเม็ดเลือดขาวตลอดระยะเวลาประมาณ 10 วันต่อมา ปรากฏการณ์นี้คล้ายคลึงกับหนูตั้งท้องปกติกล่าวคือภายหลังจากการพบเชื้ออสุจิภายในช่องคลอดแล้วจะตรวจพบแต่เซลเม็ดเลือดขาวตลอดระยะเวลา 21 วันของการตั้งท้อง

2.4.2 การหาปริมาณโมเลกุลของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

2.4.2.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (Lowry และคณะ, 1951)

สารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนมีดังนี้

สารละลาย A : 2% โซเดียมคาร์โบเนตใน 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์

สารละลาย B : 0.5% คอปเปอร์ซัลเฟตใน 1% โซเดียม-โปตัสเซียมทาร์เทรต (sodium-potassium tartrate)

สารละลาย C : ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ในอัตราส่วน 50:1 โดยปริมาตรเรียกสารผสมนี้ว่า "สารละลาย alkaline copper" สารละลายผสมนี้เตรียมใช้ภายใน 1 วันเท่านั้น

สารละลาย D : เจือจาง phenol reagent ด้วย 1 M กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

ผสม 0.4 มิลลิลิตรของของเหลวจากโพรงมดลูกหรือสารละลายที่ต้องการศึกษาหรือสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน (bovine serem albumin) กับ 2 มิลลิลิตรของสารละลาย alkaline copper ให้เข้ากันเป็นอย่างดี แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที เติม

สารละลายD 0.2มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกประมาณ 30 นาที แล้วนำสารละลายนั้นไปวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectronic 20 ที่ความยาวคลื่นแสง 500 nm

2.4.2.2 การหาปริมาณโปรตีนจากสารตะกอนโดยวิธี Lowry และคณะ (Lowry และคณะ , 1951)

นำ 0.1 มิลลิลิตรของสารตะกอนโปรตีน หรือสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน (bovine serum albumin) ผสมกับ 0.2 มิลลิลิตร 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อย่อยตะกอนโปรตีน ต่อจากนั้นนำไปผสมกับ 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย ผสม 2% โซเดียมคาร์โบเนตในน้ำกลั่นกับ 0.5% เปอร์ซัลเฟตใน 1% โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต (อัตราส่วน 1 : 50โดยปริมาตร)ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 10 นาที แล้วเติมสารละลาย ในข้อ 2.4.2.1 อีก 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีก่อนที่จะนำเอาสารละลายนั้นไปวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectronic 20 ที่ความยาวคลื่นแสง 500 nm

2.4.2.3 การหาปริมาณ Deoxyribonucleic Acid (DNA) ด้วยวิธีของ Giles และ Myers (Giles และMyers, 1965)

สะกัด DNA โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Shibko และคณะ(Shibko และคณะ,1967) โดยนำของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลอง 0.1 มิลลิลิตรไปตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย กรดเปอร์คลอริค (perchloric acid) แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แยกตะกอนโปรตีนออกโดยนำไปเซ็นตริ-ฟิวจ์(centrifuge) ที่อุณหภูมิห้องที่ 1,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ดูดเอาสารละลายใสที่ได้จำนวน 2 มิลลิลิตรไปผสมกับ 2 มิลลิลิตร 4% ไดเฟนนิลลามีน (diphenylamine) ในกรดอะซีติค 100% (glacial acetic acid) ที่เตรียมใหม่ ๆ แล้วเติม 0.1 มิลลิลิตร 1.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร acetaldehyde ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปอุ่นที่ 30 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนหรือประมาณ 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำสารละลายไป

วัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectronic 20 ที่ความยาวคลื่นแสง 595 และ 700 nmตามลำดับ คำนวณหาปริมาณ DNA โดยใช้ DNA ของ Calf-Thymus เป็นสารมาตรฐาน

2.4.2.4 การหาปริมาณ Ribonucleic Acid (RNA) ด้วยวิธีของ Lin และ Schjeide (Lin และ Schjeide ,1969)

สะกัด RNA โดยดัดแปลงจากวิธีของ Marimoto และคณะ (Marimoto และคณะ, 1974) โดยนำของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลอง 0.1 มิลลิลิตรไปผสมกับ 1.1 มิลลิลิตร 0.3 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตกตะกอนด้วย 0.5 มิลลิลิตร 1.3M กรดเปอร์คลอริคที่อุณหภูมิศูนย์องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิห้องที่ 1,000 x g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอน นำสารละลายใสที่ได้จากการเซ็นตริฟิวจ์ไปผสมกับสารละลายออร์ซินอล (oroinol) ด้วยอัตราส่วน 1 : 1โดยปริมาตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสอีก 35 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectronic 20 ที่ความยาวคลื่นแสง 670 nm คำนวณหาปริมาณ RNA โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน RNA ของยีสต์

2.4.3 การวิเคราะห์คุณลักษณะของโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลอง

2.4.3.1 การแยกโปรตีนในระบบ SDS-polyacrylamide gel

ก. การเตรียม polyacrylamide gel

เตรียม polyacrylamide gel เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน จาก stock acrylamide และ stock buffer ตามส่วนผสมที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเตรียม polyacrylamide gel เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

สารละลาย	จำนวนมิลลิลิตรของสารที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่างๆ			
	5.6%	7%	7.5%	10%
stock acrylamide	4.2	5.25	5.63	7.5
stock buffer	3.0	3.0	3.0	3.0
น้ำกลั่น	20.75	19.7	19.32	17.45
20% sodium dodecyl-sulfate (SDS)	1.5	1.5	1.5	1.5
10% ammonium persulfate	0.5	0.5	0.5	0.5
TEMED	0.05	0.05	0.05	0.05

เราเตรียม stock acrylamide โดยชั่ง acrylamide 40 กรัมผสมกับ N, N'- Methylenediacrylamide 1.5 กรัม แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ส่วน stock buffer ที่ใช้ผสม gel จะมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันในกล่องบัฟเฟอร์ (buffer chamber) สำหรับทำอิเล็คโตรโฟรีซิส

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในระบบ SDS-polyacrylamide gel มีอยู่ 2 ชนิด คือ 0.01 M tris-glycine buffer pH 8.3 (เตรียม stock buffer ที่มีความเข้มข้น 0.1 M โดยผสม 6.0 กรัม tris-(hydroxymethyl)-aminomethane กับ glycine 28.8 กรัม/ แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับสารละลายที่ได้ให้เป็น pH 8.3 ด้วย 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์) และ 0.005 M tris-HCl buffer pH 7.1 (เตรียม stock buffer ให้มีความเข้มข้น 0.95 M โดยชั่ง tris-(hydroxymethyl)-aminomethane 6.07 กรัมไปละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

แล้วนำไปผสมกับ 0.1M กรดไฮโดรคลอริคปริมาณ 457 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับให้สารละลายมี pH 7.1 ด้วย 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดนี้จะต้องนำไปละลาย SDS ให้มี SDS 0.1% ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลอง และจะต้องระวังไม่ให้สารละลายบัฟเฟอร์ขุ่น

เมื่อได้ gel เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ตามต้องการแล้วจึงใช้ pasteur pipette ดูดสารละลายนั้นใส่ลงในหลอดแก้วธรรมดา ที่ปิดปลายข้างหนึ่งด้วยพาราฟิล์ม และมีขนาด 0.6 เซ็นติเมตร X 11 เซ็นติเมตรอย่างช้า ๆ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศภายในเนื้อ gel จนกระทั่งสารละลายในหลอดแก้วมีความสูง 10 เซ็นติเมตร หยดน้ำกลั่นลงบนยอด gel อย่างรวดเร็วแต่แผ่วเบา แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ gel polymerize อย่างสมบูรณ์ เมื่อ gelแข็งตัวเต็มที่ จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่าง gel และน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากหน้า gelและแกะพาราฟิล์มออกก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ข. การเตรียมสารที่ต้องการวิเคราะห์

นำของเหลวที่ต้องการวิเคราะห์และหาปริมาณโปรตีนไว้เรียบร้อยแล้ว ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 100-150 ไมโครกรัมจำนวน 50 ไมโครลิตรไปหยดลงบนแผ่นพาราฟิล์มแล้วผสมให้เข้ากันกับ 5 ไมโครลิตร mercaptoethanol 1 หยดของ glycerol และ 5 ไมโครลิตร tracking dye (0.05% bromophenol blue) แล้วใช้ไมโคร-ปิเปต (micropipette) ขนาด 100 ไมโครลิตรดูดส่วนผสมนั้นไปหยดลงบน gel ที่เตรียมไว้

ค. การทำอีเล็คโตรโฟรีซีส

บรรจุแท่ง gelลงในกล่องบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่บัฟเฟอร์ลงในกล่องบัฟ-เฟอร์ทั้งบนและล่างจนกระทั่งท่วมปลายแท่ง gelทั้งสองข้าง ผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปใน gel เปล่า ๆ ก่อน (prerun gel) โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 3 mA/gel หรือ 5 mA/gel และกำหนดให้กล่องบนเป็นขั้วลบ และกล่องล่างเป็นขั้วบวก หลังจากนั้น

จึงหยอดสารที่ต้องการศึกษาลงบนยอด gel ด้วยไมโครปิเปต ผ่านกระแสไฟฟ้าปริมาณที่ใช้ในการทดลองเป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง โดยกำหนดจากแถบ tracking dye ตัดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบ tracking dye อยู่ห่างจากปลายล่างของแท่ง gel ประมาณ 1 เซ็นติเมตร แล้วเอาหลอด gel ไปแช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเพื่อให้ gel หดตัวและป้องกันการกระจายของแถบโปรตีน ใช้เข็มฉีดยาฉีดน้ำรอบ ๆ โดยให้เข็มอยู่ระหว่างผิว gel และหลอดแก้วเพื่อดันเอาแท่ง gel หลุดออกจากแท่งแก้ว แล้วใช้เข็มพลาสติคขนาดเล็กปักลงในเนื้อ gel ที่ตำแหน่ง tracking dye เพื่อใช้เป็นครรชนีในการเปรียบเทียบผลระหว่าง gel หลังจากนั้นนำ gel ไปแช่ในสารละลาย 10% trichloro acetic acid ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อตกตะกอนโปรตีน ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำ gel ไปย้อมสีโปรตีนด้วย 0.25% comassie brilliant blue (เตรียมน้ำยาย้อมสีโปรตีนโดยใช้ส่วนผสมดังนี้ : 0.25% comassie brilliant blue ในน้ำ : เมทานอล (metanol) กรดอะซีติค 100% (glacial acetic acid) ในอัตราส่วน 45 : 45 : 10 โดยปริมาตร นำสารละลายนี้ไปกรองเอาตะกอนขุ่น ๆ ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman no 1. ก่อนที่จะนำไปใช้น้ำยาย้อมสีโดยปกติเก็บได้นานประมาณ 3 เดือนที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าเกิดตะกอนขึ้นให้กรองเอาตะกอนออก) ย้อมสีโปรตีนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตอจากนั้นจึงนำ gel ไปล้างสีส่วนที่ติด gel ออกด้วยน้ำยาล้างสี (เตรียมน้ำยาล้างสีโดยผสมกรดอะซีติค 75 มิลลิลิตรกับเมทานอล 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 1 ลิตร) เปลี่ยนน้ำยาล้างสีหลาย ๆ ครั้งจน gel ใสและแถบน้ำเงินของโปรตีนปรากฏชัดเจน เราอาจเก็บรักษา gel นี้ในสารละลาย 5% กรดอะซีติค และเก็บในที่มืดได้เป็นระยะเวลานานหลายเดือนโดยแถบสีของโปรตีนไม่จางลงเลย

ง. การวิเคราะห์แถบโปรตีนในแท่ง gel

ทำ electrophoregram ของโปรตีนโดยนำแท่ง gel ไปที่ความยาวคลื่นแสง 560 nm ด้วยเครื่อง Linear Gel Scanner ที่ต่อกับ

Beckman Spectrophotometer Model 25 ในอัตราการ scan 2 เซ็นติเมตรต่อนาที และ chart speed 1 นิ้วต่อนาที ใช้ slit sperture ขนาด 0.2 มิลลิเมตร

2.4.3.2 การแยกโปรตีนในระบบ polyacrylamide gel electrophoresis

วิธีการเช่นเดียวกับการแยกโปรตีนโดยระบบ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis เพียงแต่เปลี่ยนระบบบัฟเฟอร์เป็นฟอสเฟต (phosphate buffer) และไม่ผสม SDS เตรียม stock buffer ความเข้มข้น 0.1M โดยนำสารละลาย disodium hydrogenphosphate 0.2 M 305 มิลลิลิตร ไปผสมกับสารละลาย sodium dihydrogenphosphate 0.039 M จำนวน 195 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับสารละลายให้เป็น pH 7.0 ด้วย 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์

2.4.3.3 การแยกโปรตีนโดยระบบ cyanogum gel electrophoresis ของ Donari และคณะ (Denari, และคณะ ; 1976)

ก. การเตรียม gel

stock cyanogum เตรียมจาก 6% cyanogum 41 ใน Tris-EDTA-Borate บัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 0.066 M tris-(hydroxymethyl)aminomethane 0.02 M กรดบอริค (boric acid) และ 0.093 M disodium ethylenediamin-tetraacetic acid (Na_2EDTA) ปรับให้เป็น pH 8.6 ด้วย 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียม gel โดยผสม 20 มิลลิลิตรของสารละลาย 6% cynogum 41 ดังกล่าวกับ 0.35 มิลลิลิตร 10% ammonium persulfate และ 50 ไมโครลิตรของ TEMED ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิศูนย์องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันมิให้ gel แข็งตัวเร็วเกินไป ใช้ pasteur pipette ดูดส่วนผสมนี้ใส่ลงในหลอดแก้วสะอาดที่เตรียมไว้ตามที่อธิบายในข้อ 2.4.3.1 (ก)

ข. การเตรียมสารที่ต้องการวิเคราะห์

นำ 50 ไมโครลิตรของสารที่ต้องการศึกษาและปรับปริมาณโปรตีนให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 100 – 150 ไมโครกรัมไปผสมให้เข้ากันกับ 25 ไมโครลิตร 13% ficoll และ 5 ไมโครลิตร 0.05% bromophenol blue หยอดสารละลายนี้ลงบนหน้า gel ที่เตรียมไว้ด้วยไมโครปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตร

ค. การทำอีเล็คโตรไฟรีซีส

ทำการหยดสารใน Tris-Borate-EDTA บัฟเฟอร์ pH 8.6 โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 1mA/gel เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องและให้กลองบนเป็นขั้วลบ และกลองล่างเป็นขั้วบวก แล้วเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 5 mA/gel ผ่านกระแสอีกประมาณ 90 นาทีหรือเมื่อแถบ tracking dye อยู่ห่างจากปลายล่างแท่ง gel ประมาณ 1 เซ็นติเมตรแล้วจึงตัดกระแสไฟฟ้า เอา gel ออกจากแท่งแก้วไปย้อมสีโปรตีนด้วย 0.25% comassie brilliant blue เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างสีที่ติดแท่ง gel ออกจน gel ใสและเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนชัดเจนด้วยน้ำยาล้างสีตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ2.4.3.1 (ค)

ง. การวิเคราะห์แถบโปรตีนในแท่ง gel

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4.3.1 (ง)

2.4.4 การทำ Autoradiography

นำหนูทดลองในระยะเอสตรัสน้ำหนัก 200–250 กรัมไปผ่าตัดใส่ห่วงคุมกำเนิดมดลูกด้านขวา และสอดไหมผ่านมดลูกด้านซ้าย แล้วฉีดตามทันทีเข้าทางช่องท้อง (i.p) ด้วย ^{3}H-leucine ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์จำนวน 25 uCi ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร หรือ ^{14}C-leucine ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์จำนวน 12.5 μCi หรือ 25 μCi ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรตามที่กำหนดในการทดลอง ปล่อยให้หนูพักฟื้นแล้วทำการเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกทั้งสองข้างในระยะเอสตรัสของวงจรถัดไป

นำของเหลวจากโพรงมดลูกที่เก็บได้ไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีที่กล่าวมาในข้อ 2.4.2.1 ของเหลวที่เหลือจะนำไปแยกชนิดโปรตีนโดยวิธี gel electrophoresis ตามวิธีของ Denari และคณะ, 1976 ดังอธิบายในข้อ 2.4.3.3 เมื่อผ่านการย้อมสี และล้างสีออกจาก gel เรียบร้อยแล้วก็นำแท่ง gel ไปแช่ในสารละลาย 95% dimethylsulfoxide 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที นำ gel ไปแช่ต่อใน 20% 2,5 diphenyloxazole ใน dimethyl-sulfoxide 3 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างน้ำกลั่นอีกประมาณ 1 ชั่วโมงโดยเปลี่ยนน้ำ 2 ครั้ง ต่อจากนั้นนำแท่ง gel ไปผ่าตามแนวยาว โดยนำไปวางให้ประกบระหว่างแผนกระจกที่สะอาด 2 แผ่นที่มีความยาวเท่ากับแท่ง gel พอดี แล้วใช้มีดผ่าแท่ง gel ให้เป็น 2 ซีก ขนาดเท่า ๆ กัน ค่อย ๆ วาง gel ทั้งสองซีกลงบนกระดาษกรองโดยระวังให้แท่ง gel อยู่ในลักษณะเส้นตรง และด้านผิวเรียบคว่ำลง gel ทั้งสองซีกอยู่ห่างกันพอประมาณ นำกระดาษกรองไปวางบน buchner funnel ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ทำให้ gel แห้งและนาบสนิทกับแผ่นกระดาษกรองโดยการกรองด้วยวิธีดูดเอาอากาศออก และปิดด้านบนของ buchner funner ด้วยแผ่นพาราฟิล์มให้สนิทเป็นเวลานานประมาณ 10–12 ชั่วโมง ให้ความดันของเครื่องดูดอากาศเท่ากับ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว จากนั้นนำกระดาษกรองที่มี gel ติดอยู่นั้นไปประกบกับแผ่นฟิล์ม X-ray ในห้องที่มืดสนิท แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในห้องมืดประมาณ 1–3 เดือนตามการทดลอง เมื่อถึงเวลาที่กำหนดนำแผ่นฟิล์มไปล้างในห้องมืดด้วย X-ray developer (Polycon'A solution1 4.5 ลิตรผสมกับ Polycon'A solution 2 47.5 มิลลิลิตร และน้ำประปา 13.5 ลิตร) เป็นเวลาประมาณ 1 นาที แล้วแช่ต่อทันทีในสารละลาย Hardeners' type 500 มิลลิลิตรในน้ำประปา 17.5 ลิตร 1 นาที ต่อจากนั้นนำแผ่นฟิล์มไปแช่ในfixer (Super Amfix A : น้ำประปา ในอัตรส่วน 1 : 3 โดยปริมาตร) อีก 5 นาที แล้วล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำประปาอีกครั้งจนปราศจากน้ำยาล้างฟิล์ม นำไปสังเกตดูแถบรังสีของโปรตีนที่ติดฉลาก ^{3}H -leucine หรือ ^{14}C-leucine ถ้ามีแถบรังสีแผ่นฟิล์มจะปรากฏเป็นแถบสีดำที่บริเวณนั้น

2.4.5 การติดฉลาก (incorporation) ^{3}H-leucine ของโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูก หรือเยื่อบุมดลูกของหนูที่ใส่ห่วงและไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

เราศึกษาการสังเคราะห์โปรตีนโดยการติดตามการติดฉลากของ ^{3}H-leucine เข้าไปในตะกอนมหโมเลกุลในกรดไตรคลอโรอะซีติก(trichloroacetic acid insoluble material)

2.4.5.1 การศึกษาการติดฉลาก ^{3}H-leucine โดยวิธี Confined loop

นำหนูทดลองในระยะเอสตรัสน้ำหนักประมาณ 200-250 กรัมไปผ่าตัดเปิดหน้าท้องเวลา 9.00 น. เพื่อใส่ห่วงคุมกำเนิดทางปีกมดลูกด้านขวา และสอดไหมผ่านปีกมดลูกด้านซ้าย จากนั้นใช้ไหมผ่าตัดผูกมดลูกด้านบนและด้านล่างทั้งสองข้างให้เป็นรูปกระเปาะฉีด ^{3}H-leucine ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์เข้าไปในโพรงมดลูกข้างละ 12.5 µCi ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงเย็บปิดหน้าท้อง ฆ่าหนูทดลองในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กันคือ 1 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 2 วัน 3 วัน และ 4 วันตามลำดับ ติดตามการติดฉลากของ ^{3}H-leucine ต่อไปโดยการตัดปีกมดลูกทั้งสองข้างออกไปเราะเอาไขมันที่ติดอยู่ออกให้หมด แยกเอามดลูกแต่ละข้างไปล้างด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 2 มิลลิลิตร แล้วเก็บของเหลวที่ได้นั้นไปศึกษาต่อไป ส่วนเยื่อบุมดลูก(endometrium) แยกออกตามวิธีของ Katzenellenbogen และ Leake ,1974 โดยใช้ spatula ขูดมดลูกเบา ๆ นำเซลที่ขูดได้ไปละลายใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ แยกสารละลายออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 2.4.2.2 อีกส่วนหนึ่งนำไปหาปริมาณโปรตีนที่ติดฉลาก ^{3}H-leucine โดยนำแต่ละส่วนที่แยกได้ไปตกตะกอนด้วย 10% trichloroacetic acid ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปอุ่นที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิศูนย์องศาเซลเซียสอย่างน้อย 10 นาที แล้วนำตะกอนไปกรองบน glass fiber filter (Whatman, GF/A) ขนาด 2.4 เซนติเมตร กรองด้วยเครื่อง millipore filter แล้วล้างตะกอนโปรตีนนั้นที่ 4 องศาเซลเซียสด้วย 25 มิลลิลิตร 10% trichloroacetic acid ซึ่งมีกรดอะมิโน leucine ที่ไม่ติดฉลาก ^{3}H ผสมอยู่ด้วยความเข้มข้น

0.5 มิลลิกรัม/ 1 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองไปใส่ลงใน vial และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติม scintillation fluid (PPO 5 กรัมผสมกับPOPOP 0.3 กรัมใน toluene 1,000 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายที่ได้กับ triton X-100 ในอัตราส่วน2 : 1 โดยปริมาตร) (Turner ,1971) จำนวน 5 มิลลิลิตรลงใน vial หาปริมาณกัมมันตรังสีด้วยเครื่องมือ Packard Tri-Carb Model 3390 โดยมี beta-particle energy สูงสุด 0.018 MeV channel selection 50-1,000 และมีประสิทธิภาพของเครื่องสำหรับ ^{3}H เท่ากับ 44.9%

2.4.5.2 <u>การศึกษาการติดฉลาก ^{3}H-leucine โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal หรือi.p) ของหนูทดลอง</u>

นำหนูทดลองในระยะเอสตรัสที่มีน้ำหนักประมาณ 200-250 กรัมไปใส่ห่วงคุมกำเนิดที่มดลูกด้านขวา และสอดไหมผ่านมดลูกด้านซ้าย แล้วฉีดตามทันทีด้วย ^{3}H-leucine ใน 0.85%โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 25 μCi ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรทางช่องท้อง (i.p) เวลา 9.00 น. ฆ่าหนูทดลองเมื่อถึงระยะเอสตรัสต่อ ๆ ไปตามเวลาที่กำหนดในการทดลอง (เอสตรัสที่ 1 2 หรือ 3) นำเยื่อบุมดลูก และของเหลวจากโพรงมดลูกที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีน และปริมาณสารที่ติดฉลากด้วย ^{3}H-leucine ดังวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.4.5.1

2.4.5.3 <u>การศึกษาการติดฉลาก ^{3}H-leucine แบบ pulse labelling</u>

นำหนูทดลองในระยะวงจรสืบพันธุ์ต่าง ๆ กันทั้งที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด หนูตั้งท้องปกติ และหนูตั้งท้องเทียมไปฉีด ^{3}H-leucine ใน 0.85%โซเดียมคลอไรด์จำนวน 25 μCi ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรทางช่องท้อง (i.p.) ของหนูทดลองเวลา 9.00 น. ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงก่อนที่จะนำหนูทดลองไปฆ่า เพื่อเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกของหนูทดลอง และนำปีกมดลูกทั้งสอง ข้างไปแยกเอาเยื่อบุมดลูก หาปริมาณโปรตีนและปริมาณสารติดฉลาก ^{3}H-leucine ของของเหลวจากโพรงมดลูก และเยื่อบุมดลูกดังวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.4.5.1

2.4.6 การทดลองฉีด cyclohexiมide แก่หนูทดลอง

2.4.6.1 การฉีด cyclohexiมide ทางช่องท้องแก่หนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

นำหนูทดลองในระยะเอสตรัสที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดทางปีมดลูกด้านขวา และสอดไหมผ่านทางปีกมดลูกด้านซ้ายไป ฉีดทางช่องท้องด้วยสารละลาย cyclohexiมide ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัมหนูทดลอง เก็บของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองทั้งสองข้างในระยะเอสตรัสของวงจรต่อไป

2.4.6.2 การทดลองฉีด cyclohexiมide ให้แก่หนูที่ตั้งท้อง

นำหนูทดลองในระยะโปรเอสตรัสน้ำหนัก 200-250 กรัมไปผ่าตัดใส่ห่วงคุมกำเนิดที่มดลูกด้านขวา และลอดไหมผ่านมดลูกด้านซ้าย ฉีดตามทันทีด้วย cyclo-hexiมide ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัมหนูทดลอง ทางช่องท้อง (i.p.) หลังจากนั้นนำหนูไปผสมกับหนูเพศผู้ทันที ผ่าดูผลการทดลองเมื่อหนูตั้งท้อง 15 วัน

2.4.7 การแยกสะกัดของเหลวจากโพรงมดลูกโดยวิธี Dialysis

2.4.7.1 วิธี Dialysis

รวบรวมของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดปริมาณ 10 มิลลิลิตรไป dialyses ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 500 มิลลิลิตร หรือในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1,000 เท่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันหรือ 24 ชั่วโมง ตามลำดับโดยให้กวนตลอดเวลา นำของเหลวส่วนที่อยู่ภายในถุง dialyse (non-dialysate fraction) และของเหลวที่อยู่ภายนอกถุง dialyse (dialysate fraction) lyo-philize เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.4.7.2 การศึกษาประสิทธิภาพของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้

นำผงแป้งที่ได้จากการ lyophilize ในข้อ 2.4.7.1 และไปละลายใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาตรเท่าเดิม เอาสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร ฉีดเข้าไปในโพรงมดลูกหนูทดลองท้อง 4 วันทางปีกมดลูกด้านขวา ส่วนปีกมดลูกด้านซ้ายฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่หวงคุมกำเนิดปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เช่นกัน เย็บปิดหน้าท้อง นำไปผ่าตัดดูผลการทดลองเมื่อหนูตั้งท้อง 15 วัน

2.4.7.3 วิธีทดสอบคุณสมบัติสภาพคงความร้อนของชีวโมเลกุล

นำสารละลายส่วน dialysate และ non-dialysate จากข้อ 2.4.7.1 ไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งให้อุณหภูมิลดลงจนถึง 37 องศาเซลเซียสก่อนที่จะนำ 0.2 มิลลิลิตรของแต่ละส่วนไปฉีดในโพรงมดลูกด้านขวาของหนูท้อง 4 วัน ส่วนปีกมดลูกด้านซ้ายปล่อยไว้ตามปกติ ผ่าดูผลการทดลองเมื่อหนูตั้งท้อง 15 วัน

2.4.7.4 วิธีทดสอบคุณสมบัติการคืนรูป (reconstitution) ของของเหลวจากโพรงมดลูกภายหลังจากการแยกด้วยวิธี Dialysis

นำ dialysate หรือ non-dialysate ที่ lyophilize ได้ไปละลายใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์โดยให้มีปริมาตรเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาตรก่อนการทำ dialysis นำสารละลายทั้งสองชนิดปริมาณเท่า ๆ กันไปผสมกันอีกครั้งหนึ่ง ปรับให้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วนำ 0.2 มิลลิลิตรของสารละลายผสมนั้น กลับเข้าไปฉีดในโพรงมดลูกด้านขวาของหนูท้อง 4 วัน ส่วนมดลูกด้านซ้ายปล่อยไว้ตามปกติ ผ่าดูผลการทดลองเมื่อหนูตั้งท้อง 15 วัน

2.4.8 การแยกเม็ดเลือดขาว

2.4.8.1 การแยกเม็ดเลือดขาวจากเลือดหนูทดลอง

เก็บเลือดจากหนูทดลองไปผสมกับ anticoaggulant (1.5% disodium methylene diamine tetrachloroacetic acid และ 0.7% โซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น) ด้วยอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร แล้วนำไปเซ็นตริฟิวจ์ให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอนที่ 560 x g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาชั้นเม็ดเลือดขาวซึ่งอยู่ระหว่างชีรัมและเม็ดเลือดแดงไปล้าง 3 ครั้งด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์เพื่อกำจัด anticoaggulant ออกไป เก็บเม็ดเลือดขาวโดยการเซ็นตริฟิวจ์ที่ 560 x g ประมาณ 10 นาที แล้วทำให้เป็นสารละลายเม็ดเลือดขาวใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์

2.4.8.2 <u>การทดสอบคุณภาพของเม็ดเลือดขาว</u>

นำเอาสารละลายเม็ดเลือดขาวใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่แยกได้ไปผสมกับ 0.2% trypan blue ด้วยอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายนั้นไปหยดลงบนแผ่นแก้วที่สะอาดเพื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 10 x 100 ตรวจการย้อมสีของเม็ดเลือดขาว ถ้าภายในเซลเม็ดเลือดขาวย้อมติดสี trypan blue แสดงว่าเม็ดเลือดขาวนั้นตายแล้ว แต่ถ้าเม็ดเลือดขาวไม่ย้อมติดสี trypan blue แสดงว่าเม็ดเลือดขาวนั้นยังมีชีวิตอยู่ (Kissmeyer-Niesen และ Thorsby , 1970)

2.4.8.3 <u>การทดลองฉีดเม็ดเลือดขาว</u>

นำเอาสารละลายเม็ดเลือดขาวใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่แยกได้ปรับให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับที่มีอยู่ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด หลังจากนั้นนำเอาสารละลายเม็ดเลือดขาว 0.2 มิลลิลิตรฉีดเข้าไปในโพรงมดลูกด้านขวา ส่วนโพรงมดลูกด้านซ้ายฉีดด้วยของเหลวที่ได้จากโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดด้วยปริมาณเท่ากัน ดูผลการทดลองเมื่อหนูตั้งท้องได้ 15 วัน