บทที่ 3

วิธีทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

3.1.1 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร pH 8.0

ใช้กรดบอริค 6.18 กรัม โปตัสเซียมคลอไรด์ 40 มิลลิกรัม คัลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท 40 มิลลิกรัม และแมกนิเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรท 42 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,750 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 2 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใช้ภายใน 1 สัปดาห์

3.1.2 สารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรนที่มีความเข้มข้นของผงถ่าน 5 เปอร์เซนต์และเด็กซ์แตรน 0.1 เปอร์เซนต์ (Dextran - coated charcoal suspension)

ใช้เด็กซ์แตรนที่ -150 จำนวน 0.05 กรัม ละลายในบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) 50 มิลลิลิตร ซึ่งใส่ในบีคเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องคนด้วยแรงแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) จนเด็กซ์แตรนละลายหมด เติมผงถ่าน 2.5 กรัม และคนให้เข้ากัน ตักฝ้าที่ลอยอยู่บนผิวของสารละลายออก แล้วคนต่อที่ 4 องศาเซลเซียสนานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง สารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรนนี้เตรียมในวันที่ทำการทดลอง

3.1.3 สารละลายโปรตีน

ใช้อัลบูมินของคน 1.1 กรัม และแกมมากลอบบูลินของคน 330 มิลลิกรัม ละลายในบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 18 ชั่วโมง แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นของเบคแมน (Beckman refrigerated centrifuge, J - 21C) ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกส่วนใสข้างบนใส่หลอดพลาสติกขนาด 12x75 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ทำให้เจือจางเป็น 10 เท่าด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1)

3.1.4 สารละลายมาตรฐาน

3.1.4.1 สารละลายสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 2.048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้สเปอร์มิดีนไตรไฮโดรคลอไรด์ 0.3590 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แบ่งมา 1 มิลลิลิตร ทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.4.2 สารละลายพูเทรสซีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 2.048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้พูเทรสซีนไดไฮโดรคลอไรด์ 0.3742 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แบ่งมา 1 มิลลิลิตรทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.4.3 สารละลายสเปอร์มีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 8.192 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้สเปอร์มีนเตทตระไฮโดรคลอไรด์ 0.3524 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แบ่งมา 1 มิลลิลิตร และทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.4.4 สารละลายคาดาเวอรีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 131.964 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้คาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ 22.5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.4.5 สารละลายออร์นิทีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20.967 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้ออร์นิทีนไฮโดรคลอไรด์ 133.8 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร แบ่งมา 1 มิลลิลิตร และทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ทั้งหมดเก็บไว้ในขวดพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.1.5 สารละลายสเปอร์มิดีนติดฉลากที่มีปริมาณรังสี 200,000 dpm ต่อมิลลิลิตร

ก่อนที่จะนำสเปอร์มิดีนติดฉลากมาใช้ในการทดลอง ควรทดสอบความบริสุทธิ์ตามวิธีใน

ข้อ 3 (ภาคผนวก) ถ้ามีสารรังสีเจือปนมากกว่าร้อยละ 10 ไม่ควรนำมาใช้ในเรดิโอ อิมมูโนแอสเสย์

ใช้สเปอร์มิดีนติดฉลาก (1 มิลลิคูรีต่อมิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) 20 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีน 177.8 พิโคกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร และมีปริมาณรังสีประมาณ 200,000 dpm ต่อมิลลิลิตร

3.1.6 สารละลายซินทิลเลชั่น (Scintillation fluid)

ใช้ 2,5 ไดฟินิลออกซาโซล (2,5 - diphenyloxazole) 10 กรัม ละลายในโทลูอีน (toluene) 2 ลิตร เติมไตรตรอนเอ็กซ์ - 100 (triton x-100) 1 ลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้

3.2 การเตรียมปัสสาวะสำหรับใช้ควบคุมคุณภาพของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีน

เตรียมโดยการเจือจางปัสสาวะด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่างกัน 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง สูง ผสมให้เข้ากันอย่างดีแล้วแบ่งใส่หลอดทดลองพลาสติกขนาด 12x75 มิลลิเมตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมคุณภาพ (quality control) ในแต่ละการทดลอง

3.3 การเตรียมคอนจูเกตระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำ

ใช้คาร์บอไดอิไมด์ (carbodiimide) เป็นตัวช่วยในการเกาะกันของสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำและติดตามปฏิกิริยาด้วยสเปอร์มิดีนติดฉลากซึ่งจะทำให้ทราบปริมาณของสเปอร์มิดีนที่เกาะกับโปรตีนตัวนำ

3.3.1 การคำนวณหาน้ำหนักของสารตั้งต้นที่จะใช้ในการเตรียมคอนจูเกต

สมมุติว่า อัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้น (reagent molar ratio) ที่ต้องการเตรียมคือ สเปอร์มิดีน : อัลบูมิน : คาร์บอไดอิไมด์ เป็น 1,000 : 1 : 100 ดังนั้นต้องใช้ปริมาณสารตั้งต้นคิดเป็นน้ำหนักของสเปอร์มิดีนไตรไฮโดรคลอไรด์ : อัลบูมิน : คาร์บอไดอิไมด์ไฮโดรคลอไรด์ = 1,000x254.64 : 1x67,000 : 100x191.71

= 228 : 60 : 17.2

(น้ำหนักโมเลกุลของอัลบูมินเท่ากับ 67,000 ดาลตัน สเปอร์มิดีนไตรไฮโดรคลอไรด์เท่ากับ 254.64 ดาลตัน และคาร์บอไดอิไมด์ ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 191.71 ดาลตัน)

3.3.2 การเตรียมคอนจูเกต

สารละลาย ก ใช้โปรตีนตัวนำ 60 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน 1.5 มิลลิลิตร ในบีคเกอร์พลาสติกขนาด 20 มิลลิลิตร คนโดยใช้เครื่องคนด้วยแรงแม่เหล็กเบา ๆ ระวังอย่าให้เกิดฟอง

สารละลาย ข ใช้สเปอร์มิดีนไตรไฮโดรคลอไรด์ 228.03 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 12x75 มิลลิเมตร และสารละลายสเปอร์มิดีนติดฉลาก (2 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า (Vari - Whirl mixer)

สารละลาย ค ละลายคาร์บอไดอิไมด์ไฮโดรคลอไรด์ 291.86 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนจนได้ 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 12x75 มิลลิเมตร

ค่อย ๆ เติมสารละลาย ข ลงในสารละลาย ก ที่ละหยดซึ่งคนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องคนด้วยแรงแม่เหล็ก แล้วค่อย ๆ เติมสารละลาย ค จนหมด ล้างหลอดทดลองของสารละลาย ข และ ค ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลาย ก แล้วทำปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 4 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน คนต่อไปอีก 15 นาที ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส แล้วอินคิวเบทต่อเป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิเดิม แบ่งสารละลายเก็บไว้ 0.3 มิลลิลิตร

3.3.3 การแยกและการทำคอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยใช้เซฟฟาเด็กซ์จี - 75

นำสารละลายที่เหลือจากข้อ 3.3.2 จำนวน 3.7 มิลลิลิตร ผ่านในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์จี - 75 (จากข้อ 4 ภาคผนวก) ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ ด้วยอัตราเร็วของการไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายเป็นส่วน ๆ ละ 3 มิลลิลิตร จำนวน 27 ส่วน นำแต่ละส่วนไปหาโปรตีนโดยวัดความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร (OD_{280}) เขียนกราฟระหว่าง OD_{280} (แกนตั้ง) กับสารละลายแต่ละส่วน (fraction number) ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์(แกนนอน) ปรากฏว่ามีพีค (peak) อยู่ระหว่างสารละลายส่วนที่ 9 ถึง 20 จึงรวมสารละลายส่วนที่ 9-20 แล้ววัดปริมาตรทั้งหมด

3.3.4 การทำคอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการไดอะไลส์ (Dialysis)

นำสารละลายจากข้อ 3.3.3 ใส่ถุงไดอะไลซีสซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5/8 นิ้ว ไดอะไลส์ในน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) 4 ลิตร นาน 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำ 4 ครั้ง

3.3.5 การทำคอนจูเกตให้แห้ง

นำสารละลายจากข้อ 3.3.4 ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งขณะที่ยังแข็งอยู่ (lyophilize) นานประมาณ 7 ชั่วโมง คอนจูเกตที่ได้จะเห็นมีลักษณะสีขาว นำไปใส่ขวดขนาด 20 มิลลิลิตร และใส่ไว้ในขวดพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีซิลิกาเจลสีน้ำเงินเพื่อดูดความชื้น เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 การหาอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำ (Incorporation molar ratio)

ในการหาอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำจำเป็นต้องหาปริมาณโปรตีนและปริมาณรังสีที่มีอยู่ในสารข้อ 3.3.2 และ ข้อ 3.3.5 โดยนำสารละลายของข้อ 3.3.2 มา 150 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และนำสเปอร์มิดีนคอนจูเกตจากข้อ 3.3.5 มา 5 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ทั้งสองชนิดไปหาปริมาณโปรตีนและปริมาณรังสี ดังนี้

3.3.6.1 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายจากข้อ 3.3.6 ตามวิธีของ Lowry (จากข้อ 1 ภาคผนวก)

3.3.6.2 การวัดปริมาณสารรังสี

นำสารละลายจากข้อ 3.3.6 มาอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายซินทิลเลชั่น (จากข้อ 3.1.6) 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า ทำซ้ำสารละลายละ 3 ซ้ำ (triplicate) วัดปริมาณรังสีโดยใช้เครื่องนับรังสีเบตา (liquid scintillation counter)

3.3.6.3 การคำนวณ

สมมุติว่าสารละลายจากข้อ 3.3.2 จำนวน 4 มิลลิลิตร วัดปริมาณรังสีได้ x dpm ต่อปริมาณสเปอร์มิดีนที่ใส่เท่ากับ a มิลลิกรัม

สารละลายของข้อ 3.3.5 วัดปริมาณรังสีได้ y dpm ต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม

ดังนั้นคอนจูเกต (จากข้อ 3.3.5) จะมีสเปอร์มิดีนเท่ากับ $\frac{ay}{x}$ มิลลิกรัมเกาะอยู่กับโปรตีน 1 มิลลิกรัม

จะได้ว่าอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างสเปอร์มิดีนกับโปรตีนตัวนำในคอนจูเกตที่ทำให้แห้งและบริสุทธิ์แล้ว

$$= \frac{ay}{145.25\ x} : \frac{1}{67,000}$$

$$= \frac{67,000\ ay}{145.25\ x} : 1$$

(โปรตีนตัวนำคือ อัลบูมินของวัวมีน้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน และสเปอร์มิดีนมีน้ำหนักโมเลกุล145.25 ดาลตัน)

3.4 วิธีทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติสเปอร์มิดีน

3.4.1 การเตรียมอิมมูโนเจนสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง

เลือกสเปอร์มิดีนคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของสเปอร์มิดีนจับกับโปรตีนตัวนำในอัตราส่วนสูง ๆ (สเปอร์มิดีน : อัลบูมิน เท่ากับ 25-30:1, หรือสเปอร์มิดีน : ไทโรกลอบบูลินเท่ากับ 203-601:1) มาฉีดสัตว์ทดลอง ละลายสเปอร์มิดีนคอนจูเกตในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำสารละลายมาผสมกับฟรอยด์แอดจูแวนท์ (Freund's adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (MSE homogenizer) ใช้ความเร็วสูงสุด 5-10 นาที จนได้อิมัลชั่น (emulsion) ซึ่งมีลักษณะขุ่นขาวและมีความหนืดคล้ายน้ำมันใส่ผมบรายครีม ทดสอบอิมัลชั่นโดยหยดลงในน้ำ ถ้าไม่แตกกระจายแสดงว่าใช้ได้ เตรียมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วใช้ฉีดสัตว์ทดลองในวันนั้น

3.4.2 การฉีดอิมมูโนเจนในสัตว์ทดลอง

อิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 นำมาฉีดเข้าสัตว์ทดลองที่ใต้ผิวหนังด้านหลังหลาย ๆ จุด (intradermal multiple sites injection)

3.4.2.1 กระต่าย โกนขนกระต่ายบริเวณหลังโดยใช้กรรไกรและเครื่องตัดผมไฟฟ้าเป็นบริเวณกว้างประมาณ 10 เซนติเมตร ยาวประมาณ 20 เซนติเมตร ใช้อิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 จำนวน 2 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีสเปอร์มิดีนคอนจูเกตอยู่ 1 มิลลิกรัม ฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังที่โกนขนออกแล้วประมาณ 30 จุดโดยใช้เข็มเบอร์ 25 แต่ละจุดห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร

3.4.2.2 <u>หนูตะเภา</u> ใช้อีเทอร์ทำให้หนูตะเภาสลบแล้วจึงโกนขนบริเวณหลังโดยใช้เครื่องตัดผมไฟฟ้าเป็นบริเวณกว้างประมาณ 5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ใช้อิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีสเปอร์มิดีนคอนจูเกตอยู่ 0.1 มิลลิกรัม ฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังที่โกนขนออกแล้วประมาณ 7 จุด ใช้เข็มเบอร์ 25 แต่ละจุดห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร

3.4.3 <u>ระยะเวลาของการฉีดสัตว์ทดลอง</u>

หลังจากฉีดอิมมูโนเจนในสัตว์ทดลองครั้งแรก (first injection) แล้วต้องฉีดซ้ำ (booster injection) อีกเป็นระยะ ๆ ดังนี้คือ

3.4.3.1 <u>กระต่าย</u> ใช้อักษรย่อ R แบ่งเป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 มี 4 ตัว คือ R_1, R_2, R_3 และ R_4 ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตฉีดซ้ำทุก 4 สัปดาห์ 8 ครั้ง หลังจากนั้นอีก 8 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำอีก 1 ครั้ง และต่อจากนั้นอีก 7 สัปดาห์จึงฉีดเฉพาะ R_1 และ R_3 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 มี 3 ตัว คือ R_5, R_6 และ R_7 ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง ฉีดซ้ำหลังจากการฉีดซ้ำครั้งที่สอง 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นอีก 8 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำอีก 1 ครั้ง และต่อจากนั้นอีก 4 สัปดาห์จึงฉีดเฉพาะ R_6 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 3 มี 4 ตัว คือ R_8, R_9, R_{10} และ R_{11} ฉีดด้วยสเปอร์มิดีนคอนจูเกตซ้ำหลังจากฉีดครั้งแรก 2 สัปดาห์ 1 ครั้ง หลังจากนั้นฉีดซ้ำทุก ๆ 4 สัปดาห์ 4 ครั้ง (ยกเว้น R_{11} ฉีดซ้ำเพียง 3 ครั้ง)

กลุ่มที่ 4 มี 3 ตัว คือ R_{12}, R_{13} และ R_{14} ฉีดซ้ำหลังจากฉีดครั้งแรก 2 สัปดาห์ 1 ครั้ง ต่อจากนั้นจึงฉีดซ้ำทุก ๆ 4 สัปดาห์ อีก 2 ครั้ง

3.4.3.2 <u>หนูตะเภา</u> ใช้อักษรย่อ G แบ่งเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 มี 3 ตัว คือ G_1, G_2 และ G_3 ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง และหลังจากนั้นฉีดซ้ำทุกเดือน 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 มี 9 ตัว คือ G_4, G_5, G_6, G_7, G_8, G_9, G_{10}, G_{11} และ G_{12} ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 4 ครั้ง

กลุ่มที่ 3 มี 22 ตัว คือ G_{13}, G_{14}, G_{15}, G_{16}, G_{17}, G_{18}, G_{19}, G_{20}, G_{21}, G_{22}, G_{23}, G_{24}, G_{25}, G_{26}, G_{27}, G_{28}, G_{29}, G_{30}, G_{31}, G_{32}, G_{33} และ G_{34}

ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 4 มี 23 ตัว คือ G_{35}, G_{36}, G_{37}, G_{38}, G_{39}, G_{40}, G_{41}, G_{42}, G_{43}, G_{44}, G_{45}, G_{46}, G_{47}, G_{48}, G_{49}, G_{50}, G_{51}, G_{52}, G_{53}, G_{54}, G_{55}, G_{56} และ G_{57} ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง

กลุ่มที่ 5 มี 10 ตัว คือ G_{58}, G_{59}, G_{60}, G_{61}, G_{62}, G_{63}, G_{64}, G_{65}, G_{66}, และ G_{67} ฉีดซ้ำทุก 2 สัปดาห์ 2 ครั้ง

3.4.4 <u>ระยะเวลาของการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง</u>

3.4.4.1 <u>กระต่าย</u> การเจาะเลือดกระต่ายจะเจาะที่ใบหูกระต่ายโดยใช้มีดโกน โกนขนที่ใบหูบริเวณเส้นเลือดดำออกแล้วทาไซลีน (xylene) พอหมาด ๆ ที่ปลายใบหูเพื่อให้เส้นเลือดขยายแล้วใช้สำลีชุบน้ำเช็ดไซลีนออก ใช้อัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์เช็ดเส้นเลือดดำที่จะเจาะ แล้วใช้ปลายใบมีดสำหรับผ่าตัดเบอร์ 11 สะกิดที่เส้นเลือดดำให้เป็นแผลเล็ก ๆ แคบ ๆ หลังจากนั้นจึงรองรับเลือดที่หยดออกมาด้วยบีคเกอร์ขนาด 30 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเลือดแข็งตัว (clot) ดีแล้ว จึงนำไปปั่นแยกซีรั่มโดยใช้เครื่องปั่นของเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 1,000 x g นาน 10 นาที แยกซีรั่มใส่หลอดทดลองพลาสติกขนาด 12x75 มิลลิเมตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ในการเจาะเลือดจะเจาะก่อนฉีดอิมมูโนเจนครั้งแรก (เจาะประมาณ 5 มิลลิลิตร) และหลังจากฉีดอิมมูโนเจนแต่ละครั้ง 2 สัปดาห์ (เจาะประมาณ 25 มิลลิลิตร) แบ่งส่วนหนึ่งมาหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีน ถ้าซีรั่มครั้งใดมีแอนติสเปอร์มิดีนสูง ก็เจาะเลือดกระต่าย 3-4 ครั้ง ติดต่อกันโดยการเจาะแต่ละครั้งจะเว้นระยะเวลาให้ห่างกันประมาณ 4 วัน และครั้งละประมาณ 25 มิลลิลิตร ปั่นแยกและเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน

3.4.4.2 <u>หนูตะเภา</u> ทำให้หนูตะเภาสลบโดยใช้อีเทอร์ แล้วจึงเจาะเลือดจากหัวใจของหนูโดยใช้เข็มเบอร์ 21 จะเจาะเลือดก่อนฉีดอิมมูโนเจนครั้งแรกประมาณ 3 มิลลิลิตร และหลังจากฉีดอิมมูโนเจนครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ จะเจาะเลือดจนหมด หนูตะเภา 1 ตัว เจาะเลือดได้ประมาณ 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแข็งตัวดีแล้วจึงนำไปปั่นแยกซีรั่มเช่นเดียวกับของกระต่าย และเก็บที่ -70 องศาเซลเซียสไว้หาปริมาณของแอนติสเปอร์มิดีนต่อไป

3.5 <u>การหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีน</u> (มนต์จันทร์ วณิชย์พันธุ์ , 2526)

ทำการทดลองโดยใช้หลอดทดลองพลาสติก (polyethylene tube) ขนาด 12x75 มิลลิเมตร แช่ในถาดน้ำแข็งนำเอาซีรั่มของสัตว์ทดลอง (แอนติบอดี) จากข้อ 3.4.4 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งไปเรื่อย ๆ (Serial double dilution) ด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) ทำการทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด (duplicate) แล้วทำการทดลองตามรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การหาปริมาณแอนติสเปอร์มิดีน

Solution	Tube		
	Total (µl)	NSB (µl)	Anti-spermidine (µl)
Antibody (serial double dilution)	-	-	100
$[^3H]$ Spermidine (20,000 dpm)	100	100	100
Borate buffer 0.05M pH 8.0	900	900	800

Total = Total $[^3H]$ spermidine tube

NSB = Non-specific binding tube

ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดีแล้วอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน (จากข้อ 3.1.3) ซึ่งคนอยู่ตลอดเวลาในถาดน้ำแข็งจำนวน 100 ไมโครลิตร ทุกหลอดยกเว้นหลอด total หลอด total เติมบอเรตบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรแทน ในการเติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรนในการทดลองแต่ละชุดจะใช้เวลาในการเติมตั้งแต่หลอดแรกจนถึงหลอดสุดท้ายไม่เกิน 5 นาที ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดีอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที โดยเริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มใส่สารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน ปั่นแยกผงถ่านออกโดยใช้เครื่องปั่นของเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสทั้งหมดของแต่ละหลอดออกมาเติมสารละลายซินทิลเลชั่น 6.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนับจำนวนสารรังสีโดยใช้เครื่องนับรังสีเบตา (liquid scintillation counter)

คำนวณร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี (% $[^3H]$ spermidine bound) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี (แกนตั้ง) กับ $\log_{10}$ ของความเจือจางของแอนติบอดี (แกนนอน) ความเจือจางของแอนติซีรั่มที่ทำให้สเปอร์มิดีนติดฉลากจับกับแอนติบอดีได้ร้อยละ 50 (50 % $[^3H]$ spermidine bound) จะแสดงถึงไตเตอร์ของแอนติบอดี (รูปที่ 9 หน้า 49)

การคำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี

$$\% \ [^3H] \text{ Spermidine bound} = \frac{[^3H]\text{Spermidine bound(cpm)-NSB(cpm)}}{\text{Total } [^3H]\text{spermidine(cpm) - NSB(cpm)}} \times 100$$

3.6 การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแอนติสเปอร์มิดีน

3.6.1 การหาค่า Ka ของแอนติสเปอร์มิดีน (Affinity constant of antibody)

ทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐานความเข้มข้น 0 ถึง 512 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 5 หลอด (5 replicates) ตามรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน

Solution	Tube		
	Total (µl)	NSB (µl)	Standard - spermidine (µl)
Standard spermidine (0-512 pg/µl)	-	-	100
[^{3}H] Spermidine (20,000 dpm)	100	100	100
Antibody (1:10 dilution)	100	-	100
Borate buffer 0.05M pH8.0	800	900	700

Total = Total [^{3}H] spermidine tube

NSB = Non-specific binding tube

ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดี อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน (จากข้อ 3.1.2) ซึ่งคนอยู่ตลอดเวลาในถาดน้ำแข็งจำนวน 100 ไมโครลิตรทุกหลอด ยกเว้นหลอด total เติมบอเรตบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรแทน ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดีตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เริ่มจับเวลาตั้งแต่เติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน) จึงนำไปปั่นแยกผงถ่านออกโดยใช้เครื่องปั่นของเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสทั้งหมดของแต่ละหลอดมาเติมสารละลายซินทิลเลชั่น (จากข้อ 3.1.6) 6.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนับปริมาณรังสีด้วยเครื่องนับรังสีเบตา

คำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี ([^{3}H] spermidine bound) เช่นเดียวกับข้อ 3.5 หน้า 28 นำค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี แต่ละความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐานมาหาค่าเฉลี่ย (n=5) คำนวณหาความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนที่ไม่จับกับแอนติบอดี (free spermidine) และที่จับกับแอนติบอดี (bound spermidine) ที่มีในแต่ละหลอดทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน แล้วหาอัตราส่วนของสเปอร์มิดีนที่จับแอนติบอดีกับสเปอร์มิดีนที่ไม่จับแอนติบอดี (bound / free ratio) แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนดังกล่าว (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสเปอร์

มิดีนที่จับกับแอนติบอดี (แกนนอน) จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งได้จากการวิเคราะห์รีเกรสชันเส้นตรงแบบธรรมดา (simple linear regression) ความชัน (slope) ของเส้นกราฟจะมีค่าเท่ากับ - Ka (Scatchard , 1949)

3.6.2 <u>การหาความจำเพาะของแอนติสเปอร์มีดีน (Specificity)</u>

การศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีทำได้โดยการทดสอบร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิด (% cross reaction) ตามวิธีของ Abraham และคณะ (1969) โดยเลือกสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสเปอร์มิดีน ซึ่งอาจมีอยู่ในตัวอย่างปัสสาวะ เช่น พูเทรสซีน สเปอร์มีน คาดาเวอรีน และออร์นิทีน นำมาทำการทดลองพร้อม ๆ กับสเปอร์มิดีนมาตรฐาน นำสารที่ต้องการจะทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิด และสเปอร์มิดีนมาตรฐานมาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งไปเรื่อย ๆ (Serial double dilution) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ แล้วนำมาทำการทดลองตามตารางที่ 2 หน้า 29 ทำการทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด หาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี (ตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28) ในแต่ละความเข้มข้น ให้ร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดีในหลอดที่ไม่มีสเปอร์มิดีนมาตรฐานเป็น 100 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดีกับ $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐานหรือของสารที่ต้องการทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิด คำนวณหาร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดได้ดังนี้

สมมุติ a เป็นปริมาณของสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่ทำให้สเปอร์มิดีนติดฉลากจับกับแอนติบอดีได้น้อยลงร้อยละ 50

b เป็นปริมาณของสาร ก ที่ต้องการทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิดที่ทำให้สเปอร์มิดีนติดฉลากจับกับแอนติบอดีได้น้อยลงร้อยละ 50

ร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดของสาร ก $= 100 \frac{a}{b}$

3.7 <u>การศึกษาความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์</u>

3.7.1 <u>ความไวของวิธีวัด</u> (Sensitivity)

ทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสเปอร์มิดีนมาตรฐานความเข้มข้น 0 ถึง 512 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามตารางที่ 2 (หน้า 29) โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 5 หลอด

(5 replicates) แล้วหาความไวของวิธีวัดตามวิธีของ Midgley (1969) โดยคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของค่าร้อยละของสเปอร์มีดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี (% [^{3}H] spermidine bound) ที่ความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐานเป็นศูนย์ ที่ค่าร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดีซึ่งคำนวณได้ที่ระดับความเชื่อถือได้ 95 เปอร์เซนต์ (mean % [^{3}H] spermidine bound of zero standard tube - 2SD) แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนจากกราฟมาตรฐานก็จะได้ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่วัดได้อย่างถูกต้อง นั่นคือ ถือว่าเป็นความไวของวิธีวัด

3.7.2 ความแม่นยำของวิธีวัด (Precision)

นำปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีน ต่ำ กลาง และสูง (จากข้อ 3.2.2) มาศึกษาความแม่นยำของวิธีวัดได้ดังนี้

3.7.2.1 ความแม่นยำในการทดลองเดียวกัน (Within assay precision)

ทำการทดลองหาปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีน ต่ำ กลาง และสูง ตามตารางที่ 2 (หน้า 29) โดยทำซ้ำกันตัวอย่างละ 12 ครั้งในการทดลองเดียวกันแล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำโดยคิดเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, % CV)

3.7.2.2 ความแม่นยำระหว่างการทดลอง (Between assay precision)

หาปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีน ต่ำ กลาง และสูง ตามตารางที่ 2 (หน้า 29) โดยทำซ้ำกัน 5, 13 และ 10 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งแต่ละครั้งทำต่างวันและต่างการทดลองกันแล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำโดยคิดเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, CV)

คำนวณได้จากสูตร $$\% \text{ CV} = \frac{\text{SD}}{\text{mean}} \times 100$$

3.7.3 ความถูกต้องของวิธีวัด (Accuracy)

3.7.3.1 เปอร์เซนต์รีคอบเวอรี่ (% Recovery)

ทำการทดลองโดยใช้ปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนค่อนข้างต่ำมาเติมสเปอร์-

มิดีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 16 ถึง 80 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณสเปอร์มิดีนตามตารางที่ 2 (หน้า 29)แล้วคำนวณหาเปอร์เซนต์รีคอบเวอรีและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient)

การคำนวณหาเปอร์เซนต์รีคอบเวอรี่

สมมุติ ปริมาณสเปอร์มิดีนที่มีอยู่จริง a นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของปัสสาวะ

ปริมาณสเปอร์มิดีนที่วัดได้ b นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของปัสสาวะ

ดังนั้น เปอร์เซนต์รีคอบเวอรี $= 100 \frac{b}{a}$

การคำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Daniel, 1978)

จากสูตร $$\gamma = \frac{n\Sigma xiyi - (\Sigma xi)(\Sigma yi)}{\sqrt{n\Sigma xi^2 - (\Sigma xi)^2}\sqrt{n\Sigma yi^2 - (\Sigma yi)^2}}$$

γ = สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

xi = ปริมาณสเปอร์มิดีนที่มีอยู่จริง

yi = ปริมาณสเปอร์มิดีนที่วัดได้

3.7.3.2 การศึกษาพาราลเรลลิซึม (Parallelism study)

นำตัวอย่างปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนสูง ๆ มาเจือจางเป็น 1:10,1:20, 1:40 และ 1:80 ด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) แล้วนำไปหาปริมาณสเปอร์มิดีนพร้อม ๆ กับสเปอร์มิดีนมาตรฐาน ตามตารางที่ 2 หน้า 29 และคำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดีตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28 นำไปเขียนกราฟในกระดาษ logit-log โดยให้ร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดีอยู่ในแกนตั้ง (logit scale) และการเจือจางของตัวอย่างปัสสาวะและสเปอร์มิดีนมาตรฐานอยู่ในแกนนอน (log scale) จะได้กราฟเส้นตรง 2 เส้น ซึ่งได้จากการวิเคราะห์รีเกรสชันเส้นตรงแบบธรรมดา (simple linear regression) กราฟเส้นหนึ่งเป็นของสเปอร์มิดีนมาตรฐานและอีกเส้นหนึ่งเป็นตัวอย่างปัสสาวะ ทดสอบกราฟทั้ง 2 เส้นว่าขนานกันหรือไม่โดยเปรียบเทียบค่าความชัน (slope)

3.8 <u>การวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์</u> (มนต์จันทร์ วณิชยพันธุ์,2526)

นำตัวอย่างปัสสาวะมาเจือจางประมาณ 2-50 เท่า (แล้วแต่ความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนที่มีอยู่ในปัสสาวะ) ด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่วัดได้โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์แล้วจึงนำไปวัดปริมาณสเปอร์มิดีนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์พร้อมๆ กับสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0 ถึง 512 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate) ตามรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3 หน้า 34

คำนวณหาร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี ตามวิธีข้อ 3.5 หน้า 28 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของสเปอร์มิดีนติดฉลากที่จับกับแอนติบอดี (แกนตั้ง) กับ $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนมาตรฐาน (แกนนอน) หาปริมาณสเปอร์มิดีนที่มีอยู่ในตัวอย่างปัสสาวะจากกราฟสเปอร์มิดีนมาตรฐาน

ในการวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในตัวอย่างปัสสาวะทุกการทดลองจะแทรกปัสสาวะที่ใช้ควบคุมคุณภาพที่มีความเข้มข้นของสเปอร์มิดีนต่ำ กลาง และสูง (จากข้อ 3.2) หลังหลอดสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 512 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพ (quality control) ของการทดลอง

ตารางที่ 3 การวัดปริมาณสเปอร์มิดีนในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

Solution	Tube			
	Total (µl)	NSB (µl)	Standard spermidine (µl)	Urine (µl)
Standard spermidine (0-512 pg/µl)	-	-	100	-
Urine sample	-	-	-	100
$[^3H]$ Spermidine (20,000 dpm)	100	100	100	100
Antibody (1:10 dilution)	100	-	100	100
Borate buffer 0.05 M, pH 8.0	800	900	700	700

ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดีแล้วอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติมสารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน (จากข้อ 3.1.3) ซึ่งคนอยู่ตลอดเวลาในถาดน้ำแข็ง จำนวน 100 ไมโครลิตร ทุกหลอดยกเว้นหลอด total เติมบอเรตบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรแทนผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันดีอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียนเป็นเวลา 10 นาที โดยเริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มใส่สารละลายแขวนลอยผงถ่านเคลือบด้วยเด็กซ์แตรน ปั่นแยกผงถ่านออกโดยใช้เครื่องปั่นของเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสทั้งหมดของแต่ละหลอดออกมาเติมสารละลายซินทิลเลชั่น 6.2 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันนำไปนับจำนวนสารรังสีโดยใช้เครื่องนับรังสีเบตา