หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ ๑

๑. วัสดุและวิธีดำเนินการ

สารเคมี ใช้ Angiotensin I (^{125}I) radioimmunoassay Kit* ประกอบด้วย

๑.๑ Assay Buffer Concentrate

๑.๒ Charcoal Suspension

๑.๓ Angiotensin I (^{125}I) ซึ่งมี specific activity ๓๐๐ มิลลิคูรี่ต่อมิลลิกรัม

๑.๔ Angiotensin I Antiserum, Lyophilized (Rabbit)

๑.๕ Bovine Serum Albumin, Lyophilized (BSA)

๑.๖ Angiotensin I Standard. Lyopholized ที่มีความเข้มข้น ๕.๐, ๒.๕, ๑.๐, ๐.๕๗ ๐.๒๕ และ ๐.๑ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

๑.๗ Dimercapral (BAL)

๑.๘ 8-Hydroxyquinoline solution (8-HA)

๑.๙ Maleate buffer concentrate

๑.๑๐ Sodium hydroxide solution 5 N

๒. เครื่องมือที่ใช้

๒.๑ Magnetic stirrer และ stir bar

๒.๒ Autogamma Spectrometer, Model 3003, Packard, USA

๒.๓ pH meter, Model 39, Cleman, USA.

๒.๔ Hetofrig cooling bath, Type CB 60 Denmark

๒.๕ Constant temperature water bath, Cat. No 66610. Precission Scientific Co.

๒.๖ Vortex mixer. Cat. No. 1291. Lab-Line Instrument Inc. USA

๒.๗ Refrigerated centrifuge

* ของบริษัท New England Nuclear. Biomedical Assay Laboratory.

๓. พลาสม่าและวิธีเก็บ

๓.๑ วิธีเตรียมขวดที่ใช้ใส่เลือด โดยละลาย ethylenediaminetetra acetate (EDTA) ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น ๕% นำสารละลายนี้มาใส่ในขวดสำหรับเจาะเลือดโดยให้มีปริมาณ EDTA อยู่ ๑ มก. ต่อเลือดที่จะเจาะ ๑ มล.

๓.๒ นำขวดสำหรับใส่เลือดในข้อ ๓.๑ แช่ในน้ำแข็งให้เย็นจัดเสียก่อนใส่เลือด แล้วเขย่าขวดที่ใส่เลือดแล้วนี้ในน้ำแข็ง

๓.๓ นำเลือดที่เจาะได้ในข้อ ๓.๒ ไปแยกพลาสม่าออกจากเม็ดเลือดแดงทันที โดยนำไปเหวี่ยงใน refrigerated centrifuge ที่ปรับให้มีอุณหภูมิ ๔° ซ. ความเร็ว ๒๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๕ นาที

๓.๔ นำพลาสม่าที่ได้จากข้อ ๓.๓ มาแบ่งเก็บไว้ในหลอดแก้วหลอดละ ๑ มล. แล้วนำไปเก็บที่ -๒๐°ซ. ทันที

พลาสม่าที่ใช้เป็นตัวอย่างหาระดับเรนิน activity นี้แบ่งออกเป็น ๔ ประเภท คือ

ก. พลาสม่าจากผู้ที่กำลังป่วยด้วยโรคไตวายฉับพลัน และเมื่ออาการดีขึ้นจนเป็นปกติแล้ว

ข. พลาสม่าจากคนปกติซึ่งรับประทานอาหารชนิดเดียวกัน หรือใกล้เคียงกันกับผู้ป่วยในข้อ ก.

ค. พลาสม่าจากคนปกติทั่ว ๆ ไปที่ไม่ได้ควบคุมอาหาร

ง. Pooled พลาสม่า จากเจ้าหน้าที่ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

๔. การเตรียมสาร

๔.๑ Assay Buffer Concentrate ๒๕ มล. นำมาเติมน้ำกลั่นจนครบ ๕๐๐ มล. จะได้ ๐.๑ M Tris. acetate มี pH 7.4 เก็บที่ ๔°ซ.

๔.๒ Lyophilized Angiotensin I Antiserum (Rabbit) นำมาละลายด้วย Assay buffer จำนวน ๑๒๕ มล. เขย่าจนละลายเข้ากัน แล้วแบ่งเก็บใส่ขวดไว้ให้พอใช้ในแต่ละครั้ง แล้วเก็บที่ -๒๐°ซ

๔.๓ Angiotensin I (^{125}I) มี specific activity ๓๐๐ มิลลิคูรี่ต่อมิลลิกรัม มี activity ๑.๓ ไมโครคูรี่ เวลาจะใช้นำมาเติม Assay buffer ในอัตราส่วน ๑ : ๕๐๐ แล้วแบ่งกันใส่แต่ละขวดให้พอดีใช้แต่ละครั้ง เก็บที่ -๒๐° ซ.

๔.๔ Angiotensin I Standard ประกอบด้วย lyophilized standard นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นขวดละ ๒ มล. เขย่าจนละลายเข้ากันดี จะได้สารมาตรฐานของ Ag I ที่มีความเข้มข้น ๕.๐, ๒.๕, ๑.๐ ๐.๕, ๐.๒๕ และ ๐.๑ นาโนกรัมต่อ มล. แบ่งเก็บในหลอดแก้วเล็ก ๆ หลอดละ ๐.๕ มล. เพื่อสะดวกในการนำมาใช้แต่ละครั้ง

๔.๕ Bovine serum albumin (BSA) ๕% นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นขวดละ ๘ มล. เขย่าเบา ๆ จนเข้ากันดี จะได้ ๕% BSA เก็บที่ - ๒๐° ซ.

๔.๖ Charcoal suspension ๒๕ มล. ทำให้เจือจางด้วยการเติมน้ำกลั่นจนครบ ๒๕๐ มล. ปรับ pH ให้ได้ประมาณ ๗.๔ ± ๐.๒

๔.๗ Dimercapral (BAL) เป็นสารละลายของ dimercapral ใน peanut ail กับ benzyl benzoate เก็บที่ ๔° ซ.

๔.๘ Maleate buffer concentrate เป็นสารละลายเข้มข้นของ Maleic acid ละลายสารที่ตกผลึกด้วยการเขย่าแรง ๆ แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาณ ๒๕๐ มล. ปรับ pH ด้วย 5 N NaOH จนได้ pH ๖.๕ เก็บที่ ๔° ซ.

๕. <u>การเตรียมตัวอย่างพลาสม่าที่จะนำมาหาระดับเรนิน activity</u>

๕.๑ เตรียม pooled plasma ทุกครั้งที่ทำโดยนำมาละลายที่ ๔° ซ. ใช้จำนวน ๑ มล. ใส่ในหลอดแก้ว

๕.๒ นำตัวอย่างพลาสม่าของแต่ละคนที่จะหา renin activity มาละลายที่ ๔° ซ. เช่นกัน สำหรับผู้ป่วยรายที่มีการเจาะเลือดเพื่อนำมาตรวจเป็นระยะ ๆ นี้ตั้งแต่เริ่มป่วยจนหาย เป็นปกติให้นำพลาสม่าแต่ละครั้งมาทำพร้อมกันในครั้งเดียวกัน โดยใส่ในหลอดแก้วหลอดละ ๑ มล. เช่นกัน

๕.๓ ใส่ BAL ลงในตัวอย่างพลาสม่าแต่ละหลอด ๆ ละ ๑๐ ไมโครลิตร

๕.๔ ใส่ 8-HQ ลงในพลาสม่าแต่ละหลอด ๆ ละ ๑๐ ไมโครลิตร

๕.๕ ใส่ Maleate buffer ลงทุก ๆ หลอด ๆ ละ ๒ มล.

๕.๖ นำหลอดทั้งหมดดังกล่าวไปเขย่าด้วย Vortex mixer หลอดละ ๒-๕ วินาที แล้วแบ่งออกมาหลอดละประมาณ ๑ มล. ใส่หลอดทดลองใหม่ แล้วนำไป incubate ที่ ๓๗° ซ. เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง สำหรับพลาสม่าที่เหลือนำไป incubate ที่ ๔° ซ. เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง เช่นเดียวกัน

๕.๗ เมื่อ incubate ครบหนึ่งชั่วโมงแล้วนำพลาสม่าทั้งหมดที่ incubate ที่ ๓๗° ซ. และ ๔°ซ. มาใส่ใน ice bath อุณหภูมิ ๔°ซ. แล้วทำการวัดหาปริมาณ Ag I ที่เกิดขึ้นโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสต่อไป ในกรณีที่ยังไม่สามารถทำในเวลานั้นได้ให้เก็บพลาสม่าเหล่านี้ที่ - ๒๐°ซ. เสียก่อนเพื่อรอการนำออกมาทำในเวลาต่อไป

๖. <u>การเตรียมน้ำยาเพื่อนำมาใช้</u> นำน้ำยาทั้งหมดที่เก็บไว้ที่ -๒๐°ซ. มาทำให้ละลายโดยทิ้งไว้ใน ice bath ๔°ซ. รวมกับ buffer และน้ำยาชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ได้เก็บที่ - ๒๐°ซ.

๖.๑ เครื่องใช้สำหรับวัดหาปริมาณเรนิน activity ได้แก่ pipette หลอดแก้วที่มีขนาดมาตรฐานเดียวกัน สำหรับใส่สารมาตรฐานและตัวอย่างพลาสม่า เครื่องใช้เหล่านี้ต้องทำให้มีอุณหภูมิต่ำ ๆ ประมาณ ๔°ซ. ตลอดเวลาที่ใช้ทำเรดิโออิมมูโนแอสเส

๗. <u>วิธีทำกราฟมาตรฐานเพื่อใช้อ่านค่าของ Ag I</u> มีวิธีการตามลำดับดังนี้ คือ

๗.๑ เตรียมหลอดแก้วสำหรับทำ assay (จากข้อ ๖.๑) เขียนหมายเลขตั้งแต่ ๑ - ๑๖ แล้วใส่สารมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อ ๔.๔ ดังนี้ คือ

หลอดที่ ๑,๒ ใส่ assay buffer หลอดละ ๕๐๐ ไมโครลิตร และ ๕% BSA หลอดละ ๑๐๐ ไมโครลิตร

หลอดที่ ๓,๔ ใส่ ๕% BSA ๑๐๐ ไมโครลิตร

หลอดที่ ๕,๖ ใส่สารมาตรฐานที่มีปริมาณความเข้มข้น ๐.๑ นาโนกรัมต่อ มล. หลอดละ ๑๐๐ ไมโครลิตร

หลอดที่ ๗,๘ ใส่สารมาตรฐานที่มีปริมาณความเข้มข้น ๐.๒๕ นาโนกรัมต่อ มล. หลอดละ ๑๐๐ ไมโครลิตร

หลอดที่ ๙, ๑๐ ใส่สารมาตรฐานที่มีปริมาณความเข้มข้น ๐.๕ นาโนกรัมต่อ มล. หลอดละ ๑๐๐ ไมโครลิตร

หลอดที่ ๑๑,๑๒ ใส่สารมาตรฐานที่มีปริมาณความเข้มข้น ๑ นาโนกรัมต่อ มล. จำนวนหลอดละ ๑๐๐ ไมโครลิตร

หลอดที่ ๑๓,๑๔ ใส่สารมาตรฐานที่มีปริมาณความเข้มข้น ๒.๕ นาโนกรัมต่อ มล. จำนวนหลอดละ ๑๐๐ ไมโครลิตร

หลอดที่ ๑๕,๑๖ ใส่สารมาตรฐานที่มีปริมาณความเข้มข้น ๕ นาโนกรัมต่อ มล. จำนวนหลอดละ ๑๐๐ ไมโครลิตร

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

๗.๒ ใส่ ^{125}I Ag I ในข้อ ๔.๓ ลงในหลอดแก้วข้างต้นทุก ๆ หลอด หลอดละ ๑๐๐ ไมโครลิตร

๗.๓ เติม antiserum ที่เตรียมไว้ในข้อ ๔.๒ ลงในหลอดแก้วข้างต้นทุก ๆ หลอด หลอดละ ๕๐๐ ไมโครลิตรยกเว้นหลอดที่ ๑ และ ๒ แล้วนำไปผสมกันด้วย Vortex mixer หลอดละ ๒.๓ วินาที แล้วจึงนำไป incubate ใน ice bath ที่มีอุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง

หมายเหตุ ๑. สำหรับตัวอย่างพลาสม่าที่จะหาปริมาณ Ag I ก็ทำแบบเดียวกันพร้อมกับกราฟมาตรฐานแต่จะใส่พลาสม่า ๐.๑ มล. แทนสารมาตรฐาน

๒. ถ้าตัวอย่างสารพลาสม่านั้นมีปริมาณ Ag I มากจะต้องทำพลาสม่าให้เจือจางก่อน โดยใช้พลาสม่า ๐.๐๕ มล. เติม assay buffer ลงไปอีก ๐.๔ มล. ก่อนจะครบเวลา incubate เตรียม charcoal suspension เพื่อใช้ในการแยก Free และ Bound โดยนำน้ำยาที่เตรียมไว้ (ข้อ ๔.๖) ใส่ผงถ่านลงไป ๓ กรัม นำไปผสมด้วย magnetic stirrer ตลอดเวลา นำตัวอย่างทั้งหมดกลับมาใส่ใน ice bath แล้วเติม charcoal suspension ลงในหลอดทดลองหลอดละ ๕๐๐ มล. แล้วนำไปผสมด้วย Vortex mixer ประมาณหลอดละ ๒-๕ วินาที จึงนำไปปั่นแยกส่วนซึ่งเป็นน้ำออกจากผงถ่าน โดยใช้ refrigerate centrifuge $4^{\circ}C$ ปั่น ๒๐๐๐ รอบต่อนาทีเป็นเวลา ๑๕ นาที แล้วแยกโดยวิธีเทส่วนที่เป็นน้ำออกจากผงถ่าน

ส่วนผงถ่านจะเป็นส่วนของ Free

ส่วนน้ำใสจะเป็นส่วนของ Bound

เขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ที่เกิดปฏิกริยา (Bound = $\frac{B}{F + B}$) กับปริมาณความเข้มข้นของ Ag I (นาโนกรัมต่อมล.) ในหลอดที่ใส่สารมาตรฐาน ส่วนตัวอย่างพลาสม่าก็คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Bound แบบเดียวกันแล้วนำไปอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน คำนวณหาระดับเรนิน activity ออกมาเป็นค่าของนาโนกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง (ng/ml/hr)

ตารางที่ ๑ แสดงรายละเอียดในการทำ

Tube	Assay buffer (µl)	5 % BSA (µl)	สารมาตรฐาน (µl)	สารตัวอย่าง* (µl)	^{125}I Ag I (µl)	Antiserum (µl)
1,2 Blank	500	100	-	-	100	-
3,4"O"Standard	-	100	-	-	100	500
5,16Standard	-	-	100	-	100	500
4°C Sample	-	-	-	100	100	500
37°CSample	-	-	-	100	100	500

*ตัวอย่างพลาสม่าที่ใช้ทำอาจจะลดลงเป็น ๒๕ ไมโครลิตร หรือ ๕๐ ไมโครลิตร ในกรณีที่คิดว่าระดับเรนิน activity ในพลาสม่าจะมีค่ามากจนไม่สามารถอ่านค่าจากกราฟได้

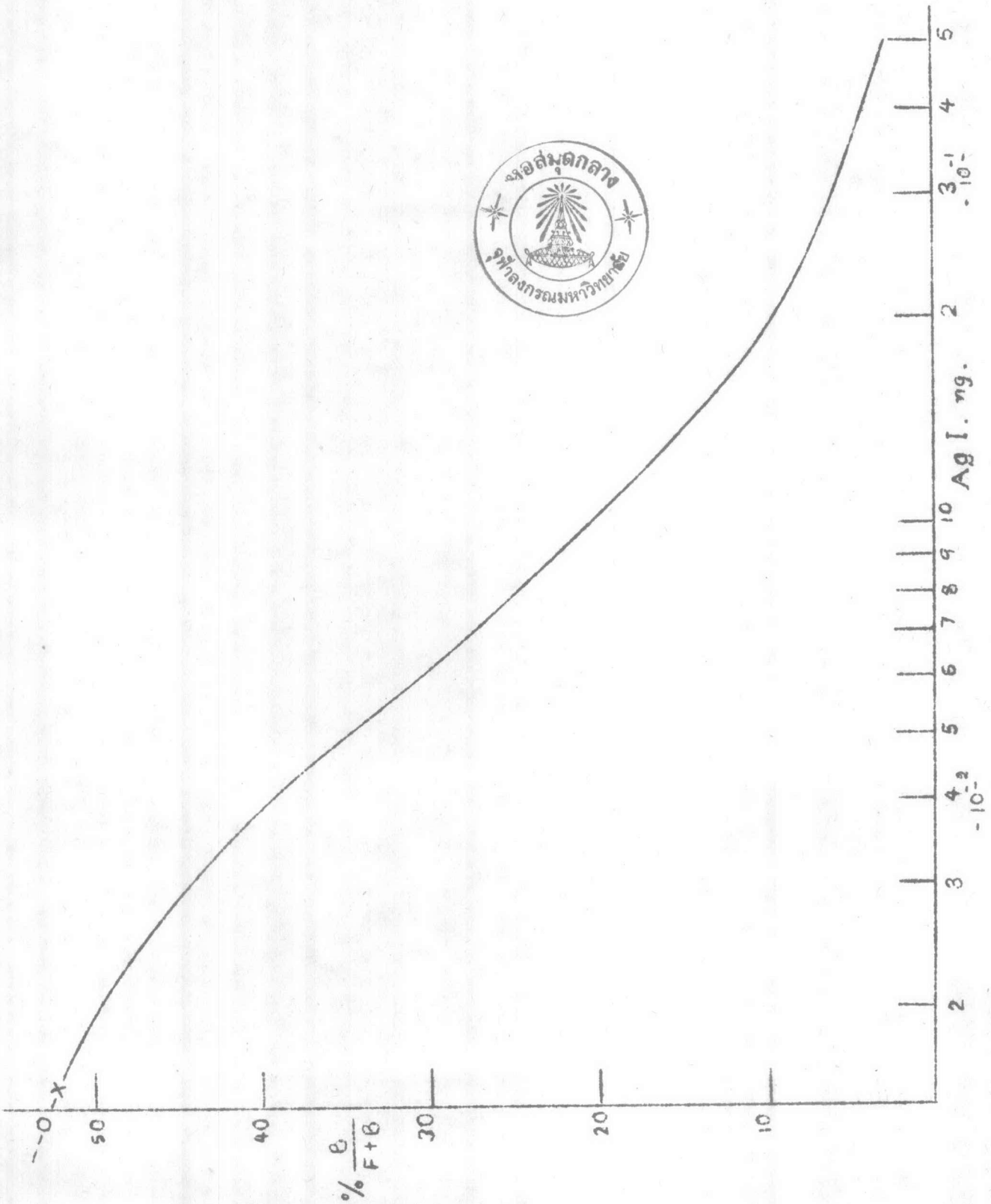
ตารางที่ ๒ ตัวอย่างของปฏิกริยาระหว่างสารมาตรฐาน และ antiserum

ปริมาณแอรจิโอเทนซิน I (นาโนกรัม/๐.๑ มล)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (F) (cpm)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (B) (cpm)	อัตราส่วน B ต่อ F + B	ค่าเฉลี่ย $\frac{B}{F+B}$
Blank	3170	127	3.08	3.43
	3022	119	3.79	
0	1310	1947	56.37	56.32
	1283	1917	56.27	
0.01	1382	1773	52.80	53.30
	1363	1827	53.80	
0.025	1590	1585	46.60	46.65
	1594	1614	46.71	
0.05	1972	1181	34.0	34.25
	1959	1205	34.5	
0.1	2417	785	21.1	20.85
	2005	753	20.6	
0.25	2747	469	10.8	10.00
	2818	419	9.2	
0.5	2791	327	6.65	6.20
	2897	290	5.75	

หมายเหตุ การทำกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณ Ag I นี้ ทำควบคู่กับการหาปริมาณแอรจิโอเทนซินในตัวอย่างพลาสม่าทุก ๆ ครั้ง

001945

กราฟรูปที่ ๑ กราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณ Ag I (ระดับเรนิน activity)



หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๓ แสดงค่าของ pooled plasma renin activity

ครั้งที่	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) * (ng/ml/hr)	± SD (ng/ml/hr)	± SE (ng/ml/hr)	% coefficiency of variation
1	2.69	0.205	0.068	7.62
2	2.11	0.133	0.044	6.30
3	2.37	0.063	0.021	2.66
4	2.163	0.153	0.051	7.07
5	2.76	0.126	0.042	4.56

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) หมายถึงค่าเฉลี่ยของ pooled serum จำนวน ๑๐ หลอดด้วยกันในการทำแต่ละครั้ง

การคำนวนหาค่า renin activity ของตัวอย่างพลาสม่า

หลังจากที่นำตัวอย่างพลาสม่าไปทำตามขบวนการของ RIA แล้วปริมาณ Ag I ที่เกิดขึ้นนำมาอ่านหาค่า renin activity จากกราฟมาตรฐานได้โดยคำนวนเป็นขั้น ๆ ดังนี้

๑. เปลี่ยนค่า count rate ในแต่ละหลอดให้เป็น count per minute (cpm)

๒. หาค่า % Bound จาก $\frac{\text{cpm (Bound) x 100}}{\text{cpm (Bound + Free)}} = \text{\% Bound}$

แล้วนำ % Bound ของแต่ละหลอดลบออกจากค่า % Bound ของ Blank

๓. ใช้ semilogarithemic graph paper plot ค่า % Bound ของสารมาตรฐาน กับค่า Ag I (รูปที่ ๑)

๔. สำหรับตัวอย่างพลาสม่าก็เช่นกัน หาค่า % Bound แล้วลบออกจากค่า % Bound ของ Blank หาค่าเฉลี่ยในแต่ละ duplicates แล้วอ่านหาค่า Ag I จากกราฟมาตรฐาน ในกรณีของตัวอย่างพลาสม่าต้องคำนวนหาค่า renin activity ที่ incubate ที่ ๔° ซ. และ ๓๗°ซ.

ในกรณีที่ใช้พลาสม่าในการทดลองหลอดละ ๐.๑ มล. จะต้องคูณค่า Ag I ที่อ่านได้จากกราฟด้วย ๓๐ และในกรณีที่พลาสม่าเข้มข้นมากและใช้ทำการทดลองเพียง ๐.๐๒๕ มล.ต่อหลอด ก็คูณด้วย ๑๒๐

๕. นำค่า Ag I ที่ได้ที่ ๔°ซ. ลบออกจากค่าที่ ๓๗°ซ. จะได้เป็นค่าของ renin activity

พลาสม่า renin activity = $ng/ml/hr^{37^\circ C} - ng/ml/hr^{4^\circ C}$

การคำนวนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) และความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error) ของค่าเฉลี่ย (mean)

ความกระจายของค่าเฉลี่ยวัดเป็นความแปรปรวน = S^2

รากที่สองของความแปรปรวน = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

Xi หมายถึงปริมาณของ renin activity เป็น ng/ml/hr

n หมายถึงจำนวนพลาสม่าตัวอย่าง

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

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

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

สัมประสิทธิ์ของการกระจาย (CV) = $\frac{SD}{\bar{X}}$