บทที่ 3

วิธีการวิจัย

ของสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ศึกษาเป็นหนูขาวพันธุ์ Charles Foster เพาะพันธุ์และเลี้ยงในห้องทดลองของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ด้วยอาหารสำหรับหนูทดลองของบริษัท F.E. Zuellig (Goid Coil Mills) โดยมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลา หนูที่ใช้ทำการทดลองเป็นตัวผู้ที่ให้หย่านมตั้งแต่อายุ 30 วัน และเลี้ยงต่อมาด้วยอาหารหนูจนมีอายุประมาณ 60-80 วัน มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 230-280 กรัม โดยเฉลี่ยประมาณ 250 กรัม

2. การให้มอร์ฟีนและ 0.85% โซเดียมคลอไรด์

2.1 การเตรียมสารละลายของมอร์ฟีน

ชั่งปริมาณของมอร์ฟีนใส่ในหลอดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดสนิทซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว เติม 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อโรคมาแล้วเช่นกัน ให้ได้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนตามที่ต้องการ สารละลายที่ได้จะนำมาใช้ภายใน 2 วัน (จากการทดลองพบว่ามอร์ฟีนละลายได้สูงสุด 50 มก./มล.)

2.2 วิธีการให้มอร์ฟีนในหนูทดลอง (Gebhart และ Mitchell, 1973)

โดยการฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ตรงเส้นกลางหลังช่วงระหว่าง thoracic กับ lumbar ครั้งละ 0.5 มล. โดยที่หนูทดลองได้รับน้ำและอาหารตามปกติ

2.3 การให้ 0.85% โซเดียมคลอไรด์

วิธีการให้เหมือนข้อ 2.2 แต่ฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์แทนมอร์ฟีน

3. วิธีทดสอบการระงับปวด (analgesic response) ในหนูทดลองหลังจากฉีดมอร์ฟีน หรือ 0.85% โซเดียมคลอไรด์

3.1 วิธีการทดสอบ (Cochin, 1968, Grotto และ Bulman, 1967)

1) ตั้งอุณหภูมิใน water bath ให้ได้ 58± 1 องศาเซลเซียล

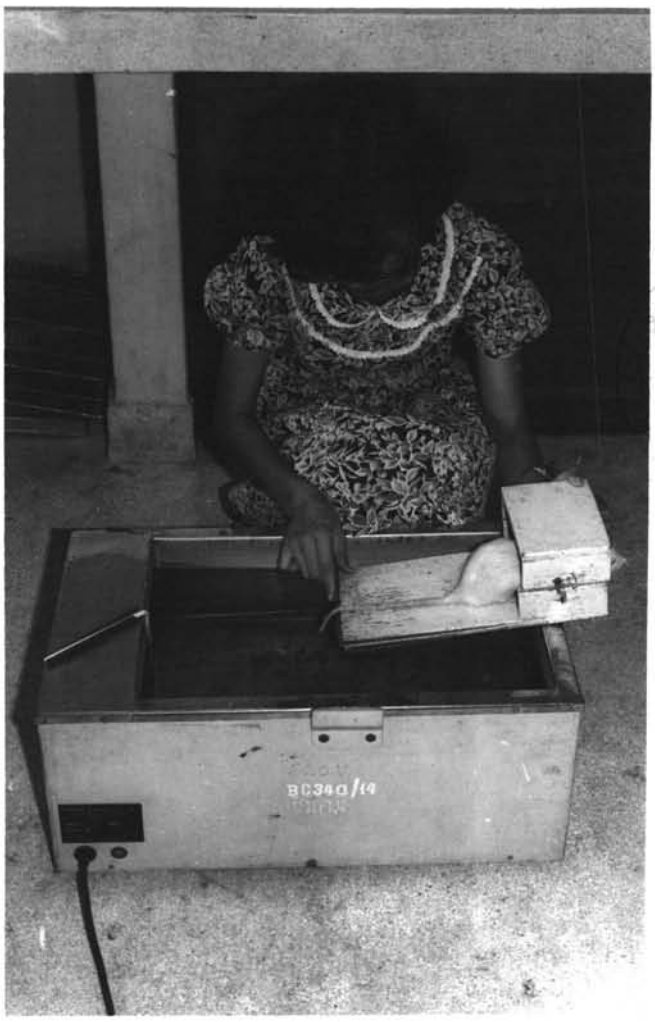
2) ใช้เครื่องมือซึ่งทำด้วยไม้และฟองน้ำ (รูปที่ 6) เป็นเครื่องบังคับให้ตัวหนูอยู่นิ่งพร้อมทั้งหางหนูวางตัวในตำแหน่งที่ทำให้ปลายหางหนูจุ่มในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 58 ± 1 องศาเซลเซียส ลึกประมาณ 1-1.5 เซ็นติเมตร

3) จับเวลาที่หางหนูเกิดการกระดิกขึ้นโดยใช้นาฬิกาจับเวลา แต่ถ้าหางหนูไม่มีการกระดิกภายใน 10 วินาที ถือว่าเป็นการเกิด complete analgesia (เมื่อทดสอบทางสถิติเวลา 10 วินาที ต่างจากเวลาที่หางหนูมีการกระดิกเกิดขึ้นในภาวะก่อนได้รับยา (1.8± 0.7 วินาที) อย่างมีนัยสำคัญ)

ในการทดลองตลอดงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบ 2 ครั้ง โดยให้แต่ละครั้งห่างกัน 1 นาที ยกเว้นในกรณีที่เกิด complete analgesia จะทดสอบ 1 ครั้งเท่านั้น

3.2 การทดสอบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนหรือ 0.85% โซเดียมคลอไรด์

แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มทดลองซึ่งได้รับการฉีดมอร์ฟีน อีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ โดยทั้ง 2 กลุ่มจะถูกทำการทดสอบตามวิธี 3.1 ก่อนได้รับการฉีดมอร์ฟีนหรือ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ หลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าไปในกลุ่มทดลองด้วยปริมาณ 5, 8 และ 10 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน (แต่ละขนาดของยาใช้หนูทดลอง 10 ตัว) ทำการทดสอบการระงับปวด ในช่วงระยะเวลาต่างๆกัน คือ 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 นาที ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ซ้ำจนครบ 4 วัน โดยทำการทดสอบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในเวลาเดียวกันทุกวัน



รูปที่ 6 ภาพที่แสดงถึงวิธีทดสอบการระงับปวดในหนูทดลอง

4. การหาค่า median "analgetic" dose (AD_{50})* (Finney, 1962 ; Gebhart และ Mitchell, 1973)

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว นำหนูทั้ง 3 กลุ่มมาฉีดมอร์ฟีนที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ความเข้มข้นที่ให้นั้นจะต้องพอเหมาะที่จะทำให้จำนวนหนูเกิด complete analgesia อยู่ในระหว่าง 10-90 เปอร์เซนต์ หลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าไปแล้ว 40 นาที จากนั้นเปลี่ยนค่าเปอร์เซนต์ complete analgesia ให้เป็นค่าทางสถิติคือ ค่า probit และเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนให้เป็นค่าของลอการิธึม นำค่าทั้ง 2 มาเขียนกราฟลากเส้นตรงผ่านทั้ง 3 จุด โดยใช้สมการ linear regression จากกราฟหาค่า AD_{50} ได้โดยกำหนดว่า AD_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่มีค่า probit เท่ากับ 5.0 ดังตัวอย่างในตารางที่ 2, รูปที่ 7

5. การทำให้หนูทดลองพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีน

กลุ่มหนูทดลองดื้อยา

ใช้หนูทั้งหมด 150 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว นำกลุ่มที่ 1 ไปหาค่า AD_{50} ตามวิธีข้อ 4 แล้วฉีดมอร์ฟีนให้กลุ่มที่ 2-5 ทุกตัวใช้มอร์ฟีนปริมาณเท่ากับค่า AD_{50} ของกลุ่มที่ 1 โดยฉีดวันละ 2 ครั้ง ระยะห่างกัน 12 ชั่วโมง (06.30 น. และ 18.30 น.) ทุกครั้งหลังจากฉีดมอร์ฟีน 40 นาที ทดสอบระยะเวลาที่เกิดการกระดิกหางหนู เมื่อหนูกลุ่มที่ 2 มี response ปกติเกิดขึ้นโดยผลการทดสอบตามวิธี 3.1 จึงนำไปหาค่า AD_{50} แล้วฉีดมอร์ฟีนให้กลุ่มที่ 3-5 ต่อไป แต่ใช้ปริมาณเพิ่มขึ้น คือใช้ปริมาณเท่ากับ AD_{50} ของหนูกลุ่มที่ 2 โดยใช้ช่วงเวลาของการฉีดคงเดิม เมื่อหนูกลุ่มที่ 3 มี response ปกติ ก็นำกลุ่มที่ 3 ไปหาค่า AD_{50} หลังจากนั้นฉีดมอร์ฟีนเท่ากับค่า AD_{50} ของกลุ่มที่ 3 เข้าไปในหนูกลุ่มที่ 4 และกลุ่มที่ 5 ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนครบทั้ง 5 กลุ่ม

---

* ปริมาณมอร์ฟีนที่ทำให้ 50 เปอร์เซนต์ปลายหางของหนูไม่มีการกระดิก (ใช้เวลานานตั้งแต่ 10 วินาทีขึ้นไป) เมื่อจุ่มปลายหางในน้ำร้อนอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 แสดงถึงองค์ประกอบต่างๆที่ใช้ในการหาค่า AD_{50}

ความเข้มข้นของมอร์ฟีน (มก./กก.น.น.ตัว)	จำนวนหนู	% ของหนูที่เกิด complete-analgesia	Probits	log ความเข้มข้นของมอร์ฟีน
4	10	20	4.16	0.6
5	10	40	4.75	0.7
6	10	60	5.84	0.78

วิธีการหาสมการ linear regression

$$y = a + bx$$

ในเมื่อ a = intercept, b = slope

$$b = \frac{\text{cov}(x, y)}{v(x)}$$

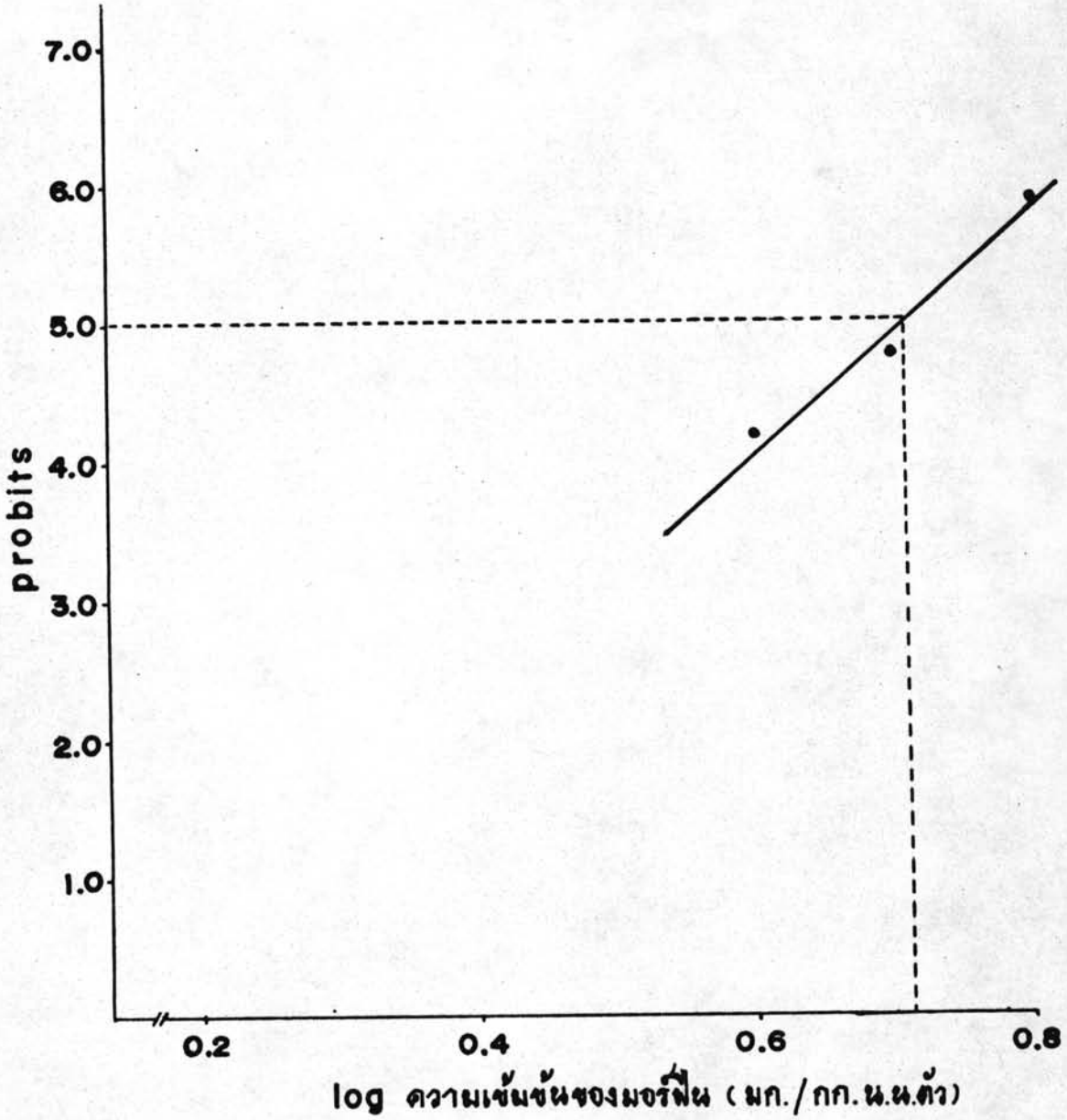
$$\text{cov}(x, y) = \Sigma_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) / n-1$$

$$v(x) = \Sigma_i (x_i - \bar{x})^2 / n-1$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

จากการคำนวณได้

$$y = -1.41 + 9.17(x)$$



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า probits กับ log ความเข้มข้นของมอร์ฟีน

i 18126212

กลุ่มหนูควบคุม

ใช้หนู 60 ตัว แบ่งออกเป็นกลุ่มละ 15 ตัว จำนวน 4 กลุ่ม ฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์เข้าไปในหนูทุกกลุ่ม โดยฉีดวันละ 2 ครั้งระยะห่างกัน 12 ชั่วโมง ทำการทดลองตามวิธี 3.1 และวัดค่า AD_{50} ในช่วงของระยะเวลาเดียวกันกับหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับยาทุกครั้ง

6. การหาปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มและสมองของหนูทดลอง

6.1 วิธีสะกัดมอร์ฟีนออกจากสมอง (Berkowitz และคณะ, 1974)

หลังจากฉีดมอร์ฟีนจำนวน 10 มก./กก.น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลอง นาน 5, 20, 40, 60, 120, 180 และ 360 นาที นำหนูทดลองที่ฉีดมอร์ฟีนในช่วงระยะเวลาต่างๆกันนี้มาฆ่าโดยการตัดคอ รีบนำสมองที่ได้มาล้างด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่เย็นทันที ชั่งน้ำหนักของสมอง เติม 0.01 N กรดไฮโดรคลอริก โดยใช้อัตราส่วน 1:4 (W/V) บดด้วยโฮโมจีไนเซอร์ชนิดใช้มือ ขนาด 15 มล. โดยชักลูกสูบขึ้นลง 20 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มาปั่นด้วยความเร็ว 30,000 xg นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วัดปริมาตรส่วนใส นำสารละลายที่ได้นี้มาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 2-3 วัน ก่อนนำมาวัดปริมาณมอร์ฟีนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (radio immunoassay)

6.2 การแยกซีรั่มออกจากเลือดของหนูทดลอง

นำเลือดจากปลายหางของหนูทดลองในหัวข้อ 6.1 หลังจากฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก.น้ำหนักตัว นานในช่วงต่างๆกันมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเม็ดเลือดแยกตัวออกจากซีรั่มแล้วจึงนำมาปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 2-3 วัน ก่อนนำมาวัดปริมาณมอร์ฟีนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

6.3 การวัดปริมาณมอร์ฟีน (Hoffmann-La Roche Inc. ซึ่งดัดแปลงจาก Spector และ Parker , 1970)

ดำเนินการทดลองโดยหน่วยวิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของ commercial radio immunoassay โดยใช้สารเคมีของบริษัท Roche ประเทศสหรัฐอเมริกา มีวิธีโดยสังเขปดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงถึงส่วนประกอบของสารต่างๆและปริมาณของสารที่ใช้

tube	normal urine (µl)	standard (µl)	I^{125} morphine (µl)	anti-serum (µl)	sample (µl)
standard morphine 1.25-40 ng/ml)	10	100	50	50	-
sample	100	-	50	50	10

นำทุกหลอดมา incubate ค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย saturated ammonium sulfate 200 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 xg นาน 1 ชั่วโมงที่ 10 องศาเซลเซียส เอาส่วนใสและตะกอนไปนับรังสีด้วยเครื่อง gamma counter และอ่านค่าของมอร์ฟีนจากกราฟมาตรฐาน ในกรณีที่ความเข้มข้นของมอร์ฟีนในสารตัวอย่างสูงเกินไปไม่สามารถอ่านจากกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนได้ให้นำสารตัวอย่างมาเจือจางด้วย 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4

ในการทดลองหาปริมาณมอร์ฟีนโดยวิธีนี้จะสร้างกราฟมาตรฐานควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง โดยให้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนตั้งแต่ 1.25-40 ng/ml นอกจากนี้ยังต้องทำ

การทดสอบกราฟมาตรฐานในแต่ละครั้งโดยใช้ urine ที่มีมอร์ฟีน 25, 50 และ 100 ng/ml

6.4 การหาปริมาณมอร์ฟีนในส่วนต่างๆของสมอง

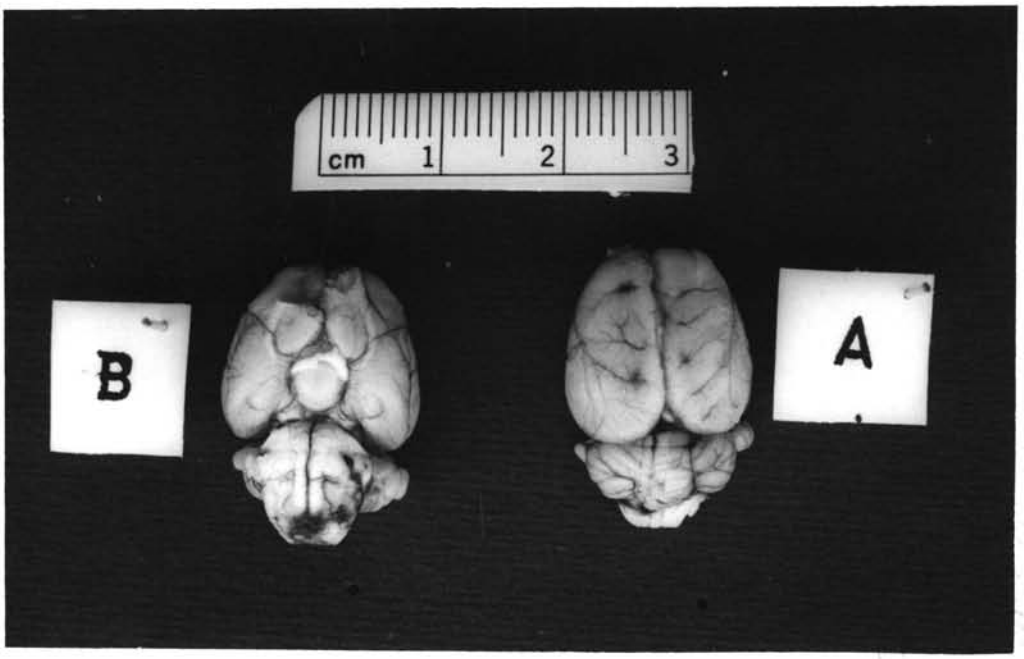
ใช้หนูทดลองจำนวน 12 ตัว มาฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนังหลังจากฉีดนาน 40 นาที จึงนำสมองที่ได้มาแบ่งเป็น 5 ส่วน โดยแบ่งตามตำแหน่งและหน้าที่ คือ cerebral cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain, cerebellum และ pons + medulla (รูปที่ 8 ก, ข) แล้วจึงดำเนินการสะกัดมอร์ฟีนตามวิธี 6.1 และนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณมอร์ฟีนตามวิธี 6.3 สำหรับหนูทดลองที่ใช้เป็นตัวควบคุมฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์แทนมอร์ฟีน แล้วดำเนินการทดลองเหมือนกับหนูกลุ่มที่ต้องการหาปริมาณมอร์ฟีนทุกอย่าง

7. การศึกษาปริมาณ cyclic AMP ในสมอง

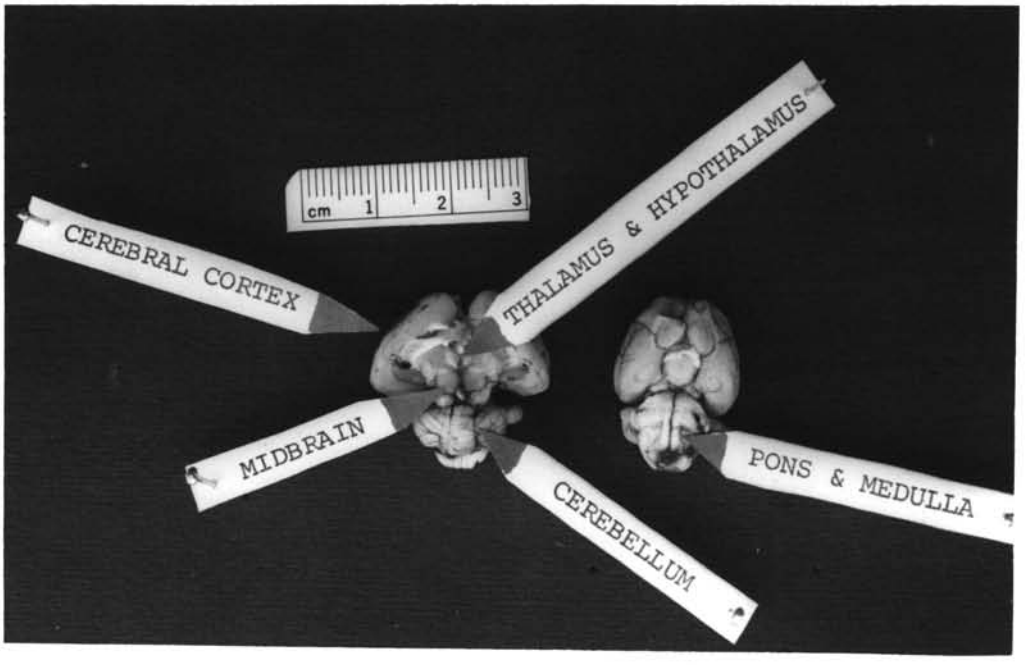
7.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ในการทดลองได้ทำการศึกษาปริมาณ cyclic AMP ในหนูทดลอง 3 สภาวะ คือ สภาวะได้รับยาแบบเรื้อรัง (chronic) , สภาวะได้รับยาแบบเฉียบพลัน (acute) และสภาวะควบคุม (control)

สภาวะได้รับยาแบบเรื้อรัง ทำได้โดยใช้หนูทดลอง 16 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม เริ่มต้นด้วยการฉีดมอร์ฟีนเท่ากับค่า AD_{50} ของหนูปกติ (5 มก./กก.น้ำหนักตัว) เข้าไปในหนูทุกตัวโดยใช้ช่วงเวลาและจำนวนครั้งเหมือนกับการทดลองตามวิธีข้อ 5 ทั้งนี้เพื่อพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนที่ระดับ AD_{50} ต่างๆกัน ทำการวัดปริมาณ cyclic AMP ในหนูทดลอง (4 ตัว) กลุ่มแรกหลังจากฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว จนครบ 3 วัน, กลุ่มที่ 2 หลังจากเพิ่มปริมาณของมอร์ฟีนด้วยค่า AD_{50} เท่ากับ 8.7 มก./กก. น้ำหนักตัวแล้วฉีดจนครบ 4 วัน, กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 หลังจากเพิ่มปริมาณของมอร์ฟีนด้วยค่า AD_{50} เท่ากับ 16.6 และ 33 มก./กก. น้ำหนักตัวแล้วฉีดต่อไปจนครบ 4 วัน



รูปที่ 8ก ภาพถ่ายของสมองหนู rat
A ด้านบน (dorsal view), B ด้านล่าง (ventral view)



รูปที่ 8ข ภาพถ่ายแสดงส่วนต่างๆของสมองหนู 5 ส่วน ซึ่งใช้วัดระดับ cyclic AMP

และ 5 วัน ตามลำดับ

สภาวะได้รับยาแบบเฉียบพลัน ใช้หนูทดลอง 16 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม เริ่มต้นด้วยการฉีดมอร์ฟีนเท่ากับค่า AD_{50} ของหนูปกติ (5 มก./กก.น้ำหนักตัว) เข้าไปในหนูทดลองทุกกลุ่มเช่นกันแล้วทำการวัดระดับ cyclic AMP ในหนูกลุ่มแรก หลังจากได้รับมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว สำหรับกลุ่มที่ 2, กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 เป็นหนูทดลองที่ถูกทำให้ดื้อยาที่ขนาดมอร์ฟีน 5, 8.7 และ 16.6 มก./กก.น้ำหนักตัว แต่จะทำการวัดระดับ cyclic AMP ทุกครั้งที่มีการเพิ่มขนาดของมอร์ฟีนแบบเฉียบพลัน คือ 8.7, 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว ตามลำดับ โดยใช้ช่วงเวลาและจำนวนครั้งเหมือนกับการทดลองในหัวข้อที่ 5

สภาวะควบคุม ใช้หนูทดลอง 12 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ทำการทดลองเช่นเดียวกับสภาวะได้รับยาแบบเรื้อรังทุกอย่าง เพียงแต่ฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์แทนมอร์ฟีน

การวัดระดับ cyclic AMP ในหนูทดลองทั้ง 3 สภาวะนี้จะวัดหลังจากฉีดมอร์ฟีน หรือ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ครั้งสุดท้ายนาน 40 นาที

7.2 การสะกัด cyclic AMP ออกจากสมอง (Brown และคณะ, 1971)

7.2.1 วิธีสะกัด cyclic AMP

นำหนูทดลองที่เตรียมจากข้อ 7.1 มาฆ่าโดยการตัดคอ ใช้กรรไกรขนาดเล็กตัดกระโหลกศีรษะ รีบเอาสมองออกมาล้างด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่แช่น้ำแข็งไว้เพื่อล้างเลือดที่อยู่รอบๆสมองออก แบ่งสมองออกเป็น 5 ส่วน (ตามรูปที่ 8ข) นำแต่ละส่วนจุ่มลงใน liquid N_2 นานประมาณ 3 นาที (ขบวนการตั้งแต่เริ่มฆ่าหนูจนถึงจุ่ม liquid N_2 กินเวลาไม่เกิน 2 นาที) ถ้าไม่สามารถจะสะกัด cyclic AMP ได้ทันทีในวันนั้นจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสไม่เกิน 2 วัน นำแต่ละส่วนของสมองซึ่งอยู่ในสภาพแช่แข็งมาชั่งน้ำหนัก แล้วจึงนำมาเติม 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก โดยใช้อัตราส่วน 6 มล./กรัม ของสมองบดด้วยโฮโมจีไนเซอร์ชนิดใช้มือ ขนาด 5 มล.

โดยชักลูกสูบขึ้นลง 20 ครั้ง ส่วนที่บดได้นำมาปั่นที่ 0-4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 27,000 xg นาน 20 นาที เทส่วนใสใส่ในหลอด quickfit ขนาด 15 มล. นำมาสะกัดเอาไตรคลอโรอะซิติกออกด้วย water saturated ether* โดยเติมเป็น 3 เท่าของปริมาณของสารละลายที่ได้จากการปั่น เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่านาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้จนแยกเป็น 2 ชั้น ใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเอาชั้นอีเธอร์ทิ้ง เอาส่วนที่เหลือมาสะกัดซ้ำอีก 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายหลังจากดูดชั้นอีเธอร์ทิ้งแล้วขจัดอีเธอร์ส่วนที่เหลือออกโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ดูดส่วนที่ได้ใส่ในขวดขนาดเล็กนำไป lyophilized จนแห้ง แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (การทดลองนี้ทำในภาชนะที่แช่น้ำแข็งตลอดเวลา)

7.2.2 วิธีการหาประสิทธิภาพของการสะกัด cyclic AMP

เติมส่วนผสมของ H^3-cyclic AMP (25 nCi/0.96 p mole) กับ cyclic AMP มาตรฐานที่มีปริมาณต่างๆกัน คือ 250, 500 และ 1,000 พิโคโมล ลงในสมองหนักประมาณ 0.15 กรัม แล้วเติม 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก ลงไปโดยใช้อัตราส่วน 6 มล./กรัม ของสมอง ทำการสะกัด cyclic AMP ตามวิธี 7.2.1 สำหรับหลอดควบคุมทำเช่นเดียวกับหลอดทดลอง แต่จะเติม H^3- cyclic AMP ลงไปหลังจากถูก lyophilized จนแห้งแล้ว หลังจากนั้นจึงนำหลอดทดลองและหลอดควบคุมมาละลายด้วย 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 ซึ่งมี 0.008 M theophylline และ 0.006 M mercaptoethanol 0.5 มล. เติม Bray's scintillation fluid 5 มล. นำไปนับปริมาณกัมมันตรังสีด้วยเครื่องมือ Packard Tri-Carb Model 3390 ซึ่งมีประสิทธิภาพของเครื่องในการวัดปริมาณ tritium เท่ากับ 44.9%

$$\text{percentage recovery} = \frac{\text{จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีหลังจากสะกัด}}{\text{จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีในหลอดควบคุม}} \times 100$$

* เตรียมโดยใช้อัตราส่วนของอีเธอร์กับน้ำ 1 : 1 โดยปริมาตร ใส่ใน separatory funnel ขนาด 250 มล. เขย่าอย่างแรงนาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จะเห็นแยกเป็น 2 ชั้น ใช้ส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง

7.3 การเตรียม binding protein ของ cyclic AMP

(ดัดแปลงจาก Brown และคณะ, 1971 กับ Gill และ Garren , 1970)

นำต่อมหมวกไตของวัวที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จนเริ่มอ่อนตัว ใช้กรรไกรและมีดตัดไขมันรอบๆชิ้นเนื้อออก หลังจากนั้นใช้ใบมีดผ่าออกเป็น 2 ซีก เอาส่วนเมดัลลา (medulla) ซึ่งเป็นส่วนชั้นในทิ้ง ส่วนชั้นนอกคือคอร์เทกซ์ (cortex) นำมาชั่งน้ำหนัก เติม Littlefields medium* เย็น โดยใช้อัตราส่วน 2 กรัมของชิ้นเนื้อ/ 3 มล. ของ medium homogenized ด้วยเครื่อง MSE homogenizer ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที และ Tri-R Teflon homogenizer ที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แล้วจึงนำมาปั่น 2,500 xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาปั่นต่อที่ 5,000 xg นาน 15 นาที ทิ้งตะกอนนำเอาเฉพาะส่วนใสมาปั่นต่อที่ความเร็ว 105,000 xg นาน 60 นาที เติม solid ammonium sulfate ลงในส่วนใสที่ได้จากการปั่นให้ได้ 45% saturation (ในขณะเติมใช้ magnetic stirrer คนตลอดเวลา) เมื่อเติมหมดแล้วให้คนต่อไปอีกนาน 45 นาที จึงนำมาปั่นที่ 10,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอาตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.01 M Tris-HCl buffer pH 7.4 ซึ่งมี 0.006 M mercaptoethanol dialyzed ด้วย buffer ชนิดเดียวกัน 500 เท่าในห้องเย็น (8 องศาเซลเซียส) นาน 12 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน buffer 2 ครั้ง ในระหว่าง dialyzed มี magnetic stirrer คนเบาๆตลอดเวลา หลังจากนั้นนำมาปั่นที่ 5,000 xg นาน 30 นาที เทส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอดขนาดเล็กหลอดละ 3 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (การทดลองนี้ต้องทำในภาชนะที่แช่น้ำแข็งตลอดเวลา)

---

* ประกอบด้วย 0.25 M sucrose, 0.025 M potassium chloride, 0.005 M magnesium chloride และ 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4

7.4 การเตรียม H^3-cyclic AMP สำหรับใช้ในการวัด cyclic AMP

H^3-cyclic AMP ที่ซื้อมาจะละลายอยู่ในส่วนผสมของ ethanol:water เท่ากับ 1 : 1 ใช้ microsyringe ดูด H^3-cyclic AMP 50 ไมโครลิตร ใส่ใน flask มาเป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน เติม 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 5 มล. แล้วเจือจางต่อให้เป็น 1 : 10 ด้วย 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 ซึ่งมี 0.008 M theophylline และ 0.006 M mercaptoethanol แบ่งใส่ในขวดเล็กๆขวดละ 3 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส H^3-cyclic AMP ที่เตรียมได้นี้จะมีความเข้มข้น 0.96 ทิโคโมล/50 ไมโครลิตร

7.5 การเตรียมสารละลายของผงถ่าน

ชั่ง bovine serum albumin 0.8 กรัม ละลายใน 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 ซึ่งมี 0.008 M theophylline และ 0.006 M mercaptoethanol 40 มล. คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากครบเวลาแล้วค่อยๆเติมผงถ่านจำนวน 4.0 กรัมลงไป และคนต่อด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายที่ได้นี้สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 อาทิตย์ ก่อนใช้ทุกครั้งจะคนด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที

7.6 การเตรียม Bray's scintillation fluid (Bray, 1960)

ชั่ง naphthalene 120 กรัม, ppo 8 กรัม, popop 0.4 กรัม เติม methanol 200 มล. และ ethylene glycol 40 มล. ทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 2 ลิตร ด้วย dioxane คนให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer เก็บไว้ในขวดสีชา ในห้องเย็น (อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส)

7.7 การหาปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

สารละลายที่ใช้หาปริมาณโปรตีนมีดังนี้

สารละลาย A : 2% โซเดียมคาร์โบเนตใน 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย B : 0.5% คอปเปอร์ซัลเฟตใน 1% โซเดียม-โปตัสเซียม-ทาร์เทรต (sodium-potassium tartrate) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย C : ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ในอัตราส่วน 50 : 1 โดยปริมาตร เรียกสารผสมนี้ว่า "สารละลาย alkaline copper" สารละลายผสมนี้เตรียมใช้ภายใน 1 วัน เท่านั้น

สารละลาย D : เจือจาง phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

ผสม 0.5 มล. ของสารละลายที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีนหรือสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน กับ 3 มล. ของสารละลาย alkaline copper เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย D 0.3 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่นแสง 650 nm. และคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยใช้กราฟมาตรฐาน

7.8 วิธีการหาปริมาณ cyclic AMP (Brown และคณะ, 1971)

นำสารตัวอย่างที่จะหา cyclic AMP จากข้อ 7.2.1 มาละลายด้วย 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 ซึ่งมี 0.008 M theophylline และ 0.006 M mercaptoethanol (assay buffer)

เตรียม incubation mixture ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 250 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, 1.6 mM theophylline, 1.2 mM mercaptoethanol สารละลายมาตรฐาน cyclic AMP (2-16 พิโคโมล) หรือสารตัวอย่าง H^3-cyclic AMP 0.96 พิโคโมล โดยเติม binding protein 0.22 มิลลิกรัม หลังสุด ก่อนเติม binding protein นำทุกหลอดแช่ลงไปในถาดน้ำแข็ง แล้วเริ่มจับเวลาของการ incubate ทันทีหลังจากเติม binding protein โดยใช้เวลา incubate 90 นาที เมื่อครบเวลาแยก H^3-cyclic AMP ซึ่งจับอยู่กับ binding protein ออกจาก H^3-cyclic AMP รูปอิสระ โดยเติมสารละลายของผงถ่าน (มีเนื้อผงถ่าน 0.01 กรัม) ที่เย็น 100 ไมโครลิตร (ก่อนเติมผงถ่านจะต้องถูกคนตลอดเวลา) เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้อีก 5 นาที จึงนำไปปั่น 4,000 รอบ/นาที ที่ 8 องศาเซลเซียส 20 นาที ดูดส่วนใส 200 ไมโครลิตร ใส่ในขวดนับรังสี เติม Bray's scintillation fluid 5 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปนับกัมมันตรังสี

ในการทดลองทุกครั้งจะตรวจสอบความสามารถของผงถ่านในการดูดซับ H^3-cyclic AMP รูปอิสระ โดยใช้สภาวะเหมือนกับการวัดปริมาณ cyclic AMP ทุกอย่าง เพียงแต่ไม่เติม binding protein และ cyclic AMP นอกจากนี้ยังทดสอบความสามารถของ H^3-cyclic AMP ในการจับกับ binding protein โดยใช้วิธีเดียวกัน แต่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน cyclic AMP