หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ และสารเคมี

สัตว์ทดลอง

ใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด คือ

1. หนูขาว (Albino rat) (Rattus norvigicus) พันธุ์ wistar เพศเมีย อายุ 2-4 เดือน

2. แฮมสเตอร์ (Golden hamster) (Cricetus auratus) เพศเมีย อายุ 2-4 เดือน

การทดลองนี้ใช้หนูที่ได้ติดตามว่ามีวงอีสตรัสเป็นปกติ (4-5 วัน) ติดต่อกันอย่างน้อย 2 cycles ก่อนนำมาใช้ สถานที่เลี้ยง คือ ห้องเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งปรับอากาศให้อุณหภูมิห้องประมาณ 25°c และควบคุมแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง คือ ระหว่าง 6.00-20.00 น. โดยเครื่องควบคุมอัตโนมัติ พร้อมทั้งให้อาหารและน้ำดื่มไว้ตลอดเวลา

ห้องปฏิบัติการ

1. เรือนเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยไพรเมต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรนโดยวิธี RIA

1. Absolute ethanol: Proanalyse Merck Germany.

2. Antiserum to progesterone: Batch 82/k and 83/k WHO RIA Reagent programme Switzerland.

3. Chacoal: Batch 81/82Q. WHO RIA Reagent Programme Switzerland.

4. Dextran: Batch 81/82/83Q. WHO RIA Reagent Programme. Switzerland.

5. Diethyl ether: Proanalyse Merck Germany.

6. Dioxane: 1,4-Dioxane AR Grade Merck Germany.

7. Disodium hydrogen orthophosphate (anhydrous): AR Grade BDH Chemical Ltd. England.

8. Gelatin: Bacto gelatin Difco Laboratory USA.

9. Liquifluor: 2,5-Diphynyloxazole (PPO) and 1,4-bis 2-(5-phenyloxazole) -Benzene; Phenyl-oxazolylphynyl-oxazolyl-phenyl (POPOP) in toluene concentrate New England Nuclear USA.

10. H^3-Progesterone: (1, 2, 3, 7-H^3) Progesterone Specific activity 104Ci/mM Radioactive concentration 1mCi/ml Amersham International Plc. England.

11. Sodium Chloride: May & Baker Ltd. England.

12. Sodium dihydrogen orthophosphate: AR Grade BDH Chemical Ltd. England.

<u>สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไดอามีน ออกซิเดส</u>

1. Aminoguanidine hemisulphate: anhydrous Sigma Chemical Company USA.

2. Diamine Oxidase: Lot 50F-8010 No. D-7876 from Porcine kidney Sigma Chemical Company USA.

3. Disodium hydrogen orthophosphate. (anhydrous): AR Grade BDH Chemical Ltd. England.

4. Liquifluor: 2,5-diphynyloxazole (PPO) and 1-4-bis 2-(5-phynyloxazole -Benzene; Phynyloxazolylphynyl-oxazolyl-phenyl (POPOP) in toluene concentrate New England Nuclear USA.

5. ^{14}C-Putrescine dihydrochloride: (1,4-C^{14}) Tetramethylene diamine dihydrochloride. Specific activity 109 mCi/mM Radioactive concerntration 50 µCi/ml. Amersharm International plc. England.

6. Sodium dihydrogen orthophosphate: AR Grade BDH Chemical Ltd England.

7. Sucrose (anhydrous): grade 1 Sigma Chemical Company USA.

8. Toluene: AR Grade Merck Germany.

<u>เครื่องมือ</u>

1. เครื่องชั่งละเอียด: Right A Weigh. W.M. Aingworth & Son Inc. USA.

2. เครื่องชั่งหยาบ: Mettler E. 200 Mettler Instrument Switzerland.

3. Micropipets: Pipetteman M. 81 Gilson France; Eppendorf 3130 Germany; Pipet Gun Clay Adams USA.

4. Dri-block heater: U-460, Thecam in corporated Princeton N.J. USA.

5. Dubnoff-metabolic shaking incubator: 17-AD-S Precision Scientific Chicago Illinoi USA.

6. β-liquid Scintillation Counter: Packard Instrument Co. Model. BPL USA.

7. Magnetic stirrer: S-18520 Thermolyne Corporation Iowa USA.

8. Mixer: M 16715 Thermolyne Corporation Iowa USA.

9. pH meter: 5985. Cole Parmer Instrument Company Chicago Illinoi 60648. USA.

10. Refrigerated centrifuge: Model PR-J International-Equipment Company Mass. USA.

11. Ultrasonic homogenizer: Braunsonic 1510 B. Braun Melsengen AG USA.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบระดับโปรเจสเตอโรนในซีรั่มในระหว่างวงอีสตรัส

การตั้งครรภ์ และ การให้นมในหนูยาวและแฮมสเตอร์

ใช้หนูยาวและแฮมสเตอร์เพศเมีย อายุ 2-4 เดือน ซึ่งมีวงอีสตรัสเป็นปกติติดต่อกันอย่างน้อย 2 cycle

การตรวจวงอีสตรัส

หนูยาว ทำ vaginal smear ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Long & Evan 1922. โดยใช้แท่งแก้วปลายมน ทำความสะอาดด้วย 70 % alcohol แล้วจุ่มใน 0.85 % NaCl. สอดเข้าภายในช่องคลอด ให้ปลายแท่งแก้วแตะเข้ากับผนังช่องคลอดเบา ๆ แล้วเอาออกมาแตะบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ตรวจดูลักษณะของเซลภายใต้กล้องจุลทัศน์ว่าเป็นเซลชนิดใด และบันทึกผล

แฮมสเตอร์ ใช้วิธีตรวจ postestrous discharge ในวันอีสตรัส ของทุก ๆ วงอีสตรัส

การผสมพันธุ์, ตรวจการตั้งครรภ์ และการเลี้ยงลูกอ่อน

หนูยาว ทำการตรวจวงอีสตรัสของหนูแม่พันธุ์ โดยการทำ vaginal smear ดูเซลจากช่องคลอด เลือกเฉพาะหนูที่มีเซลจากช่องคลอดเป็น nucleated epithelial cell ซึ่งแสดงว่าหนูนั้นอยู่ในระยะ proestrus ซึ่งช่วงสุดท้ายของระยะนี้แม่พันธุ์จะเป็นสัด (ยินยอมให้ตัวผู้ผสม) เป็นระยะที่ใกล้กับเวลาตกไข่ นำหนูเหล่านั้นไปใส่ในกรงหนูพ่อพันธุ์ โดยใช้พ่อ-พันธุ์: แม่พันธุ์ 1: 1 หรือ 2: 1 ทิ้งไว้ 1 คืน วันรุ่งขึ้นตรวจหาสเปิร์ม โดยการทำ vaginal smear เช่นกัน ถ้าพบจะนับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ (P_1) วันต่อไปก็จะเป็น P_2, P_3 ... ถ้า smear ต่อไปอีกจะพบเซลเม็ดเลือดยาวติดต่อกันไปตลอดการตั้งครรภ์ ในส่วนน้อยอาจพบเซลชนิดอื่นบ้าง แต่ถ้าพบ cornified epithelial cells จำนวนมากภายหลัง พร้อมกับพบผลึกซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งปะปนอยู่ เป็นลักษณะที่พบเมื่อเกิดการแท้ง

การเตรียมคลอด หนูยาวใช้เวลาท้องนานประมาณ 21-23 วัน เมื่อถึงวันที่ 17-18 แยกหนูที่ท้องออกเป็นกรงละ 1 ตัว หลังจากคลอดแล้วให้ลูกดูดนมจนถึง 25 วัน โดยให้มีลูกครอกละ 7 ± 1 ตัว

แฮมส์เตอร์ ทำการตรวจวงอีส์ตรัส์โดยการดูจาก postestrous discharge ดังที่กล่าวไว้ในวิธีการตรวจวงอีส์ตรัส์ของแฮมส์เตอร์ วันที่มี discharge ถือว่าเป็นวัน estrus ฉะนั้นเมื่อตรวจพบ discharge ก็จะนับต่อไป 3 วัน วันที่ 3 คือวัน proestrus จึงนำแม่พันธุ์ไปใส่ในกรงพ่อพันธุ์ โดยใช้พ่อพันธุ์: แม่พันธุ์ 1: 1 หรือ 2: 1 เช่นเดียวกับหนูขาว วันรุ่งขึ้นตรวจหาส์เปิร์ม โดยวิธี vaginal-smear ถ้าพบจะนับเป็นวันแรกของการตั้งครรภ์ (P_1) ตามปกติจะพบมี postestrous discharge ออกมาพร้อมกับส์เปิร์ม แต่บางครั้งอาจพบ sperm plug ปิดช่องคลอดอยู่ แฮมส์เตอร์ใช้เวลาท้องนานประมาณ 15 วัน จึงแยกกรงในวันที่ 12 - 13 หลังจากคลอดแล้วไม่ควรแตะต้องลูกของแฮมส์เตอร์ และไม่ควรปล่อยให้อยู่รวมกับตัวอื่น เพราะจะทำให้แม่แฮมส์เตอร์กินลูกของมันเอง

การเก็บซีรั่ม

ใช้หนูขาวและแฮมส์เตอร์เพศเมียชนิดละ 10 ตัว ซึ่งมีวงอีส์ตรัส์เป็นปกติติดต่อกันอย่างน้อย 2 cycle นำมาเจาะเลือดจากหัวใจระหว่างเวลา 9.00-12.00 น. ครั้งละ 0.8-1ml เป็นเวลา 2 cycle หลังจากนั้นเมื่อถึงวัน proestrus ก็นำไปผสมพันธุ์ ถ้าตรวจพบส์เปิร์มในวันรุ่งขึ้นก็เก็บซีรั่มต่อไป จนถึงวันที่ 25 หลังคลอด เลือดที่เจาะในแต่ละวันเก็บไว้ 1 คืนที่ 4°c จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 30 นาทีที่ 4°c แยกซีรั่มไปเก็บไว้ที่ -20°c จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาโปรเจส์เตอโรน

สารละลายและวิธีเตรียม

1. Assay buffer เตรียมโดยใช้:

Sodium dihydrogen orthophosphate	2.35 gm.
Disodium hydrogen orthophosphate (anhydrous)	11.60 gm.
Sodium chloride	8.80 gm.
Thiomersal (merthiolate)	0.10 gm.
Gelatin	1.00 gm.

มาละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร (โดยอุ่น Gelatin ในน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยก่อน) แล้วปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 เก็บไว้ที่ 4°c ใช้ได้นาน 1 เดือน

2. Charcoal suspension

เตรียมโดยใช้ Dextran 0.0625 gm. ละลายใน assay buffer 100 ml. แล้วเติม charcoal 0.625 gm. ปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้ที่ 4°c ใช้ได้นาน 1 เดือน เวลาจะใช้ต้องนำไปปั่นให้เข้ากันโดยวางอยู่บนถาดน้ำแข็งตลอดเวลาที่ใช้

3. Counting solution

เตรียมโดยใช้ toluene 3 L., liquifluor 128 ml. และ dioxane 600 ml. ผสมให้เข้ากัน

4. Progesterone working tracer

เตรียมโดยใช้ progesterone stock tracer ซึ่งมีความแรง 10 µCi/ml. จำนวน 150 µl. เป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วเติม assay buffer 15 ml. ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 100nCi/ml. หลังจากใช้แล้วไม่ควรเก็บไว้ใช้อีก ก่อนใช้เก็บไว้ที่ 4° c

5. Progesterone standard

เตรียมโดยใช้ progesterone standard จาก WHO ซึ่งบรรจุขวดอยู่แล้วมีความเข้มข้น 24nmol/L. ปิเปตสารละลายนี้ 500 µl เติม assay buffer 4.5 ml. จะได้ standard progesterone ซึ่งมีความเข้มข้น 1,200 fmol/500 µl จากนั้นทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1,200 fmol/500 ul ถึง 37.5 fmol/500 µl เตรียมแล้วใช้ทันที

6. Progesterone antisera

เตรียมโดยใช้ progesterone antisera จาก WHO ซึ่งถูกทำให้แห้งเก็บไว้ในขวด นำมาเติม 10 ml. assay buffer เขย่าให้ละลายให้หมด เตรียมแล้วใช้ทันที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

009343

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรน

ดัดแปลงจากวิธีการของ WHO, 1981 ดังนี้

การสกัดซีรั่ม

เอาตัวอย่างซีรั่มที่แช่แข็งออกมาทำละลาย แล้วปิเปตลงในหลอดทดลองรูปกรวยโดยใช้ปริมาณตัวอย่างซีรั่มดังนี้ คือ

ซีรั่มของหนูขาว ในระหว่างวงอีสตรัส ระหว่างตั้งครรภ์ และระหว่างการให้นม หลอดละ 20 µl, 10 µl และ 20 µl ตามลำดับ

ซีรั่มของแฮมสเตอร์ ในระหว่างวงอีสตรัส ระหว่างตั้งครรภ์ และระหว่างการให้นม หลอดละ 100 µl, 50 µl และ 50 µl ตามลำดับ

หลังจากนั้นเติม 20 µl ของ working tracer เพื่อทำ recovery vortex นาน 30 วินาที ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเติม 5 ml. ether vortex อีก 1 นาที แช่แข็งส่วนที่เป็นน้ำใน ethanol กับน้ำแข็งแห้ง รินส่วนใสลงในหลอดทดลองแล้วนำไปทำให้แห้งด้วย dry block heater ที่อุณหภูมิ 40-80°c นำหลอดทดลองที่ทำให้ ether แห้งสนิทดีแล้วมาทำ RIA ต่อไป

Radioimmunoassay of progesterone

นำหลอดทดลองที่ระเหย ether ออกไปแล้วนั้นมาเติม 2 ml. assay buffer โดยเติมครั้งละ 1 ml. ผสมให้เข้ากันตั้งไว้สักครู่ เติมอีก 1 ml. ผสมอีกครั้ง ปิเปตออกใส่หลอดทดลองหลอดละ 500 µl 2 หลอด เป็น assay tubes (ทำเป็น duplicate ของ assay tubes) และอีก 500 µl ใส่ vial เป็น recovery แยกออกไปต่างหาก ส่วน assay tubes รอการเติม Ab, tracer พร้อมกับ standard tubes

เตรียม standard progesterone ให้มีความเข้มข้น 37.5, 75, 150, 300, 600 และ 1,200 fmol/500 µl โดยการทำ serial dilution แต่ละความเข้มข้นทำเป็น triplicate โดยใช้ 500 µl/tube

นำ assay tubes และ standard tubes มาเติม 100 µl progesterone antisera (Ab) และ 100 µl progesterone working tracer ขณะเดียวกันก็ทำ non-specific binding (NSB), maximum binding (Bo), quality

Control (Q.C.) ซึ่งใช้ Pooled Serum แทนตัวอย่างซีรั่มดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการเติมสารละลายลงในหลอดทดลองต่าง ๆ

หลอดทดลอง	Tracer (µl)	Antisera (µl)	Buffer (µl)	Diluted serum (µl)	Diluted std. (µl)	Total (µl)
NSB	100	-	600	-	-	700
Bo	100	100	500	-	-	700
Standard	100	100	-	-	500	700
Sample	100	100	-	500	-	700
Q.C.	100	100	-	500	-	700

vortex แต่ละ assay tube นาน 30 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีแล้วเก็บไว้ที่ 4° c 20-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ tubes ออกมาวางบนน้ำแข็ง เติม 200 µl charcoal suspension vortex แล้วทิ้งไว้บนน้ำแข็งอีก 15 นาที centrifuge ที่ 2,500 rpm 4° c 10 นาที รินส่วนใสลงใน vials เติม counting solution 4.5ml และนำ recovery vial ที่แยกไว้มาเติม counting solution พร้อมกันด้วย

Total count เพื่อตรวจนับปริมาณรังสี (cpm) ของ tracer ที่เติมลงไปทั้งหมด จึงเติม 100 µl Tracer กับ 600 µl assay buffer ลงใน vial และเติม 4.5 ml counting solution ทำเป็น triplicate

Total count of recovery เพื่อตรวจนับปริมาณรังสีที่เติมลงไปก่อนการสกัด ซึ่งจะนำไปใช้ในการคำนวณ % recovery จึงเติม 20 µl tracer กับ 700 µl buffer ลงใน vial เติม 4.5 ml. counting solution ทำเป็น triplicate

การคำนวณ

1. Standard curve นำ cpm ของ standard progesterone แต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย แล้วลบออกด้วย NSB เป็น ($\bar{x}$cpm-NSB) แล้วนำแต่ละค่าไป plot กับความเข้มข้นของ standard เป็น fmol/tube บน semilogarithmic graph.

2. <u>ตัวอย่างซีรั่ม</u> นำค่า cpm ของแต่ละตัวอย่างซีรั่มซึ่งเป็น duplicate มาหาค่าเฉลี่ย ลบออกด้วย NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจาก standard curve ได้ค่าเป็น fmol/tube เปลี่ยนให้เป็น fmol/ml. โดยคิดจากปริมาตรที่ใช้ และใช้ค่า % recovery มาคำนวณหาค่าที่แท้จริง

3. <u>% recovery</u> คำนวณจากสูตร

% recovery of each sample

$$= \frac{\text{cpm of recovery vial from each sample} - Bg}{\bar{x}\ \text{cpm of total count of recovery} - Bg} \times 4 \times 100$$

เมื่อ Bg = back ground หรือ blank ซึ่งได้จาก cpm ของ vial ที่เติมเฉพาะ counting solution เท่านั้น

x4 มาจาก total count of recovery เป็น 4 เท่าของ recovery แต่ละ vial

4. <u>Quality control</u> คำนวณเช่นเดียวกับ sample และนำค่าฮอร์โมนที่วัดได้เป็น fmol/ml. ไปเปรียบเทียบกันภายในแต่ละ assay และระหว่าง assay แต่ละครั้ง เพื่อตรวจสอบ accuracy และ precision ของแต่ละ assay

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาไดอามีน ออกซิเดส ในเนื้อเยื่อมดลูกของหนูขาวและแฮมสเตอร์ในระยะแรกของการตั้งครรภ์

ใช้หนูขาวและแฮมสเตอร์เพศเมีย อายุ 2-4 เดือน ซึ่งมีวงอีสตรัสเป็นปกติติดต่อกันอย่างน้อย 2 วง ผสมกับตัวผู้ในวัน proestrus และตรวจหาสเปิร์มในวันรุ่งขึ้น ถ้าพบสเปิร์มถือว่าวันนั้นเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์

การเก็บเนื้อเยื่อมดลูก

หลังจากผสมพันธุ์และพบสเปิร์มแล้ว แบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว คือ กลุ่มที่ตั้งครรภ์ในวันที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 10 (P_3, P_4 . . . P_{10}) หนูขาวและแฮมสเตอร์ทำแบบเดียวกัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเนื้อเยื่อมดลูกดังนี้

1. ฆ่าหนูให้ตายอย่างรวดเร็วโดยการดึงคอ (cervical dislocation)
2. ผ่าตัดเอามดลูกออกมาทั้ง 2 ข้าง แยกไขมันและเส้นเลือดออกไป

2.1 ถ้าไม่พบ implantation nodules จะแยกมดลูกออกเป็นข้างซ้ายและข้างขวา นำไปชั่งน้ำหนักแต่ละข้าง แล้วใส่มดลูกแต่ละข้างลงใน vial ซึ่งมี 1 ml. 0.25 M. sucrose ที่วางอยู่บนน้ำแข็ง

2.2 ถ้าพบ implantation nodules จะแยก implantation nodules ออกจาก inter-implantation sites แล้วรวม inter-implantation sites จากมดลูกทั้ง 2 ข้างไปชั่งน้ำหนักและใส่รวมกันลงใน vial ซึ่งมี 1 ml. 0.25 M. sucrose ที่เตรียมไว้ นำ implantation nodules แต่ละอันมาแยกชั้นของเนื้อเยื่อออกเป็น ชั้นเอนโดมีเตรียม ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิด decidualization แล้วแยกเอาตัวอ่อนออกไป ชั้นไมโอมิเตรียมซึ่งเป็นกล้ามเนื้อ ชั่งน้ำหนักเนื้อเยื่อแต่ละชนิดแล้วใส่ลงใน vial ที่มี 1 ml. 0.25 M. sucrose ที่เตรียมไว้โดยแยกขวดกัน

3. นำ sample ที่อยู่ในแต่ละ vial มาวางบนถาดน้ำแข็ง ตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกร บดโดยใช้ ultrasonic homogenizer 200 w 4°c 1 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้ที่ -20°c รอการวิเคราะห์หาปริมาณไดเอมีน ออกซิเดส ภายใน 30 วัน

สารละลายและวิธีเตรียม

1. 0.2 M. Sodium phosphate buffer เตรียมโดยใช้ disodium hydrogen orthophosphate 14.20 gm. ละลายในน้ำกลั่น 500 ml. เป็นสารละลาย A

sodium dihydrogen orthophosphate 7.75 gm. ละลายในน้ำกลั่น 250 ml. เป็นสารละลาย B

ใช้สารละลาย A 500 ml. ผสมกับสารละลาย B 110 ml. นำไปตรวจวัด pH ให้ได้ 7.2

2. 0.25 M. Sucrose เตรียมโดยใช้ Sucrose 42.79 gm. ละลายในน้ำกลั่น 500 ml.

3. 0.13 mM. Aminoguanidine sulphate เตรียมโดยใช้ 0.04 gm. aminoguanidine sulphate ละลายในน้ำกลั่น 250 ml.

4. Diamine oxidase standard เตรียมโดยใช้ 40 mg. diamine oxidase ละลายใน 0.25 M. Sucrose 10 ml. จะได้ความเข้มข้น 200 mU/0.2 ml. แบ่งไว้เป็นส่วน ๆ ส่วนละ 1 ml. เก็บไว้ที่ -20 °c เมื่อต้องการใช้นำออกมาใช้ทีละส่วน โดยนำมาละลาย (thaw) แล้วทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 mU/0.2 ml. ตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นจะทำเป็น triplicate ในทุก ๆ assay

5. ^{14}C-Putrescine dihydrochloride (tracer) เตรียมโดยใช้ ^{14}C-putrescine dihydrochloride ซึ่งมีความแรง 50 μCi/ml. 80 μl. ละลายใน 10 ml. phosphate buffer จะได้ tracer ซึ่งมีความแรง 0.08 μCi/200μl. เป็น working tracer ก่อนใช้เก็บไว้ที่ 4 °c หลังจากใช้แล้วไม่ควรเก็บไว้ใช้อีก

การวิเคราะห์หาปริมาณไดอามีน ออกซิเดสในมดลูก

ดัดแปลงจากวิธีการของ Harris and Kim (1972) ดังนี้คือ เตรียมหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15 ml. ไว้บนถาดน้ำแข็ง เติม sample หรือ standard ตามตารางที่ 2 โดยทำ standard แต่ละความเข้มข้นเป็น triplicate

ตารางที่ 2 แสดงการเติมสารละลายในหลอดต่าง ๆ

หลอดทดลอง	Sample (µL)	Diluted Std. (µl)	0.25 M. Sucrose (µl)	Buffer (µl)	d.H_2O (µl)	Total (µl)
Sample	50	-	150	200	400	800
(3 doses/sample)	200	-	-	200	400	800
	500	-	-	200	100	800
Standard	-	200	-	200	400	800

เมื่อเติมสารละลายครบตามจำนวนแล้ว นำหลอดทดลองเหล่านั้นไป preincubate ใน shaking incubator 37 °c 5 นาที แล้วเริ่มทำปฏิกริยาด้วยการเติม 200 µl. ^{14}C-putrescine dihydrochloride และ incubate ต่อไปอีก 30 นาที แล้วหยุดปฏิกริยาโดยการนำหลอดทดลองออกจาก incubator มาวางบนถาดน้ำแข็ง แล้วเติม 100 µl. 0.13 mM. aminoquanidine hemisulphate, 0.5 g. sodium bicarbonate และ 10 ml. toluene ปิดฝาหลอดทุกหลอดให้แน่น เขย่าในแนวนอน 5 นาที centrifuge ที่ 1,500 rpm. 4 °c 15 นาที นำออกจาก centrifuge แล้วแช่แข็งส่วนที่เป็นน้ำในน้ำแข็งแห้งกับ ethanol หลังจากนั้นรินส่วน toluene phase ลงใน vial ซึ่งมี 400 µl. liquifluor นำ sample นี้ไปตรวจนับรังสี β 10 นาทีต่อ vial

การคำนวณ

Standard curve นำ cpm ของ standard มาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละ triplicate แล้วนำไป plot กับความเข้มข้นของ mU/tube บนกระดาษกราฟ

Sample นำ cpm ของแต่ละ duplicate มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำค่าเฉลี่ยไปอ่านค่าจาก standard curve ค่าที่ได้เป็น mU/tube ซึ่งสามารถเปลี่ยนให้เป็น mU/ml ได้โดยการคำนวณจากปริมาตรที่ใช้ในการ assay

การหาปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อ

ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry et. al.1951. โดยมีวิธีทำดังนี้

สารละลายและวิธีเตรียม

1. สารละลาย 2 % $NaCO_3$ ใน 0.1 N. NaOH เตรียมโดยใช้ 2 g. anhydrous $NaCO_3$ ละลายใน 0.1 N. NaOH 100 ml.

2. สารละลาย 1 % Copper Sulphate เตรียมโดยใช้ 1 g. $CuSO_4.5H_2O$ ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

3. สารละลาย 2 % Sodium-Potassium Tartrate เตรียมโดยใช้ 2 g. Sod.-Pot. Tartrate ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

4. Phenol Reagent of Folin-Ciocalteu, lN. เตรียมจาก Stock Solution โดยใช้ Stock Solution 1 ml. titrate กับ 0.1 N. NaOH และ Phenolphthalin คำนวณหาความเข้มข้นแล้วเจือจางให้เป็น 1 N เก็บไว้ในที่มืด

5. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยใช้ standard bovine serum albumin ทำเป็น stock solution โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 mg./ml.H_2O (1,000 µg./500 µl.) เก็บไว้ เมื่อใช้จะนำมาเจือจางให้เป็น 300, 200, 150, 100, 50, และ 25 µg./500 µl. ตามลำดับ

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ใช้ตัวอย่างเดียวกับที่นำไปหาปริมาณไดอามีน ออกซิเดส แต่นำมาเจือจางให้อยู่ในความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานคือประมาณ 50-200 µg./500 µl. โดยบันทึกปริมาณที่นำมาใช้เจือจางไว้เพื่อการคำนวณต่อไป

วิธีการหาปริมาณโปรตีน

1. เตรียม Folin Working Solution โดยใช้ 49 ml. สารละลาย 2 % $NaCO_3$ ใน 0.1 N. NaOH,0.5 ml. สารละลาย 1 % Copper Sulphate , 0.5 ml. สารละลาย 2 % Sod.-Pot. Tartrate ผสมให้เข้ากัน สารละลายนี้ควรเตรียมก่อนใช้

2. เตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 ml. แล้วเติม 3 ml. ของ Folin Working Solution ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.3 ml. ของ Phenol Reagent อย่างรวดเร็ว และผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปวัด OD ที่ 500 nm. ภายในเวลาไม่เกิน 60 นาที โดยใช้ spectronic 20. หลังจากการผสมครั้งสุดท้าย ในขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้ 0.5 ml. น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเนื้อเยื่อและทำวิธีเดียวกันโดยตลอด

<u>การคำนวณ</u>

นำค่า OD ต่าง ๆ ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานไปทำกราฟมาตรฐาน อ่านค่าความเข้มข้นในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างโดยคิดจากปริมาตรที่นำมาใช้ก่อนการเจือจาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย