หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณซีรัมแฮบโตกลอบบิน

3.1.1 เครื่อง Turbitimer ดังรูปที่ 3.1ทำหน้าที่วัดปริมาณซีรัมแฮบโตกลอบบิน มีส่วนประกอบคือ

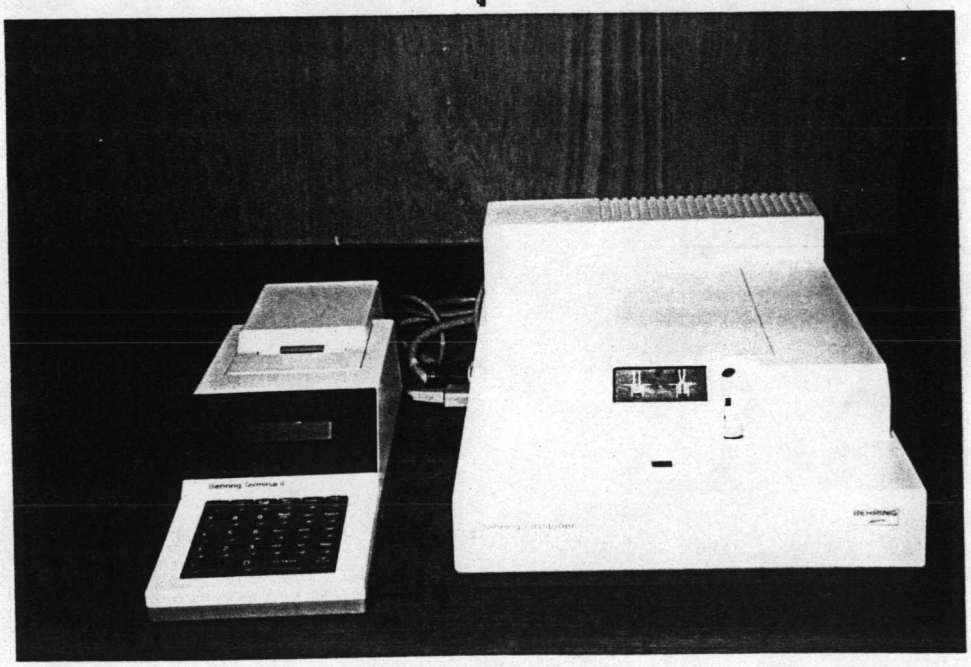
3.1.1.1 Xenon-Flash Lamp ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสง

3.1.1.2 Filter. ทำหน้าที่กรองคลื่นแสงโดยปล่อยเฉพาะคลื่นแสง ที่มีความยาวคลื่น 340 นาโนมิเตอร์

3.1.1.3 two-channal quartz fibre optic มีเลนส์ที่ประกอบกันสำหรับทำให้ลำแสงหักเหผ่านทะลุหลอดตัวอย่าง ไปยังเครื่องวัด

3.1.1.4 UV sensitive hybrid photodetection ทำหน้าที่วัดปริมาณ แสงในช่วงของอัลตาไวโอเลต แล้วเปลี่ยนสัญญาณแสงให้เป็น สัญญานทางอิเล็กทรอนิกส์

3.1.1.5 Processor ทำหน้าที่แปรสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์เป็น สัญญาณทางหน่วยนับ, เก็บข้อมูล, คำนวณ และประมวลผล



รูปที่ 3.1 แสดงเครื่อง Turbitimer

3.1.2 Tri-volume pipettes:20,25,50 ไมโครลิตร Eppendorf 4700 Germany. สำหรับดูดซีรัมตัวอย่างในการวัดปริมาณ

3.1.3 Repeating dispenser:Eppendorf multipipette 4780 and Combitip 50 มิลลิลิตร Germany.สำหรับดูดสารละลาย 0.9 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์

3.1.4 Mixer : M 16715 ,Thermolyne Corporation U.S.A. สำหรับเขย่าผสมสารละลายต่างๆ เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.1.5 Cuvette หลอดแก้วพิเศษ ใช้ใส่สารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณ

3.1.6 สารละลาย 0.9 เปอร์เซนต์ โซเดียมครอไรด์

3.1.7 Haptoglobin Antibody (Turbiquant) เป็นแอนติบอดีต่อแฮบโตกลอบบินของมนุษย์

3.2 <u>วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออเรสเซนต์</u>

3.2.1 Single-volume pipette: 200,500,1000 ไมโครลิตร Eppendorf 4700 Geramany. สำหรับดูดสารละลายต่างๆ

3.2.2 Repeating dispenser:Eppendorf Multipipette 4780 และ combitip 50 มิลลิลิตร Germany.

3.2.3 Mixer:M 16715,Thermolyne Corporation U.S.A.สำหรับเขย่าผสมสารละลายต่างๆเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.4 Water bath:Model 3575-1 Lab-line Instuments Inc.Melrose Park,ILL.เป็นเครื่องทำอุณหภูมิของน้ำให้ได้ 37 องศาเซลเซียส

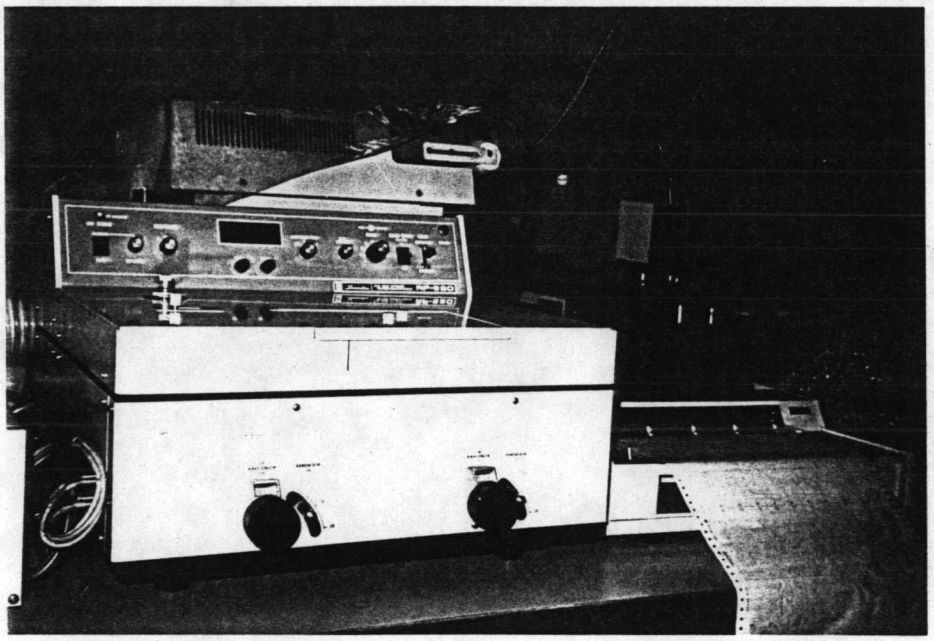
3.2.5 Spectrofluorimeter : Shimadzu Spectrofluorophotometer R520 ดังรูปที่ 3.1 ใช้สำหรับวัดปริมาณฟลูออเรสเซนต์จากสารละลายตัวอย่าง มีส่วนประกอบและลักษณะการทำงานดังรูปที่3.3

3.2.5.1 Xenon Lamp Power Supply ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสง

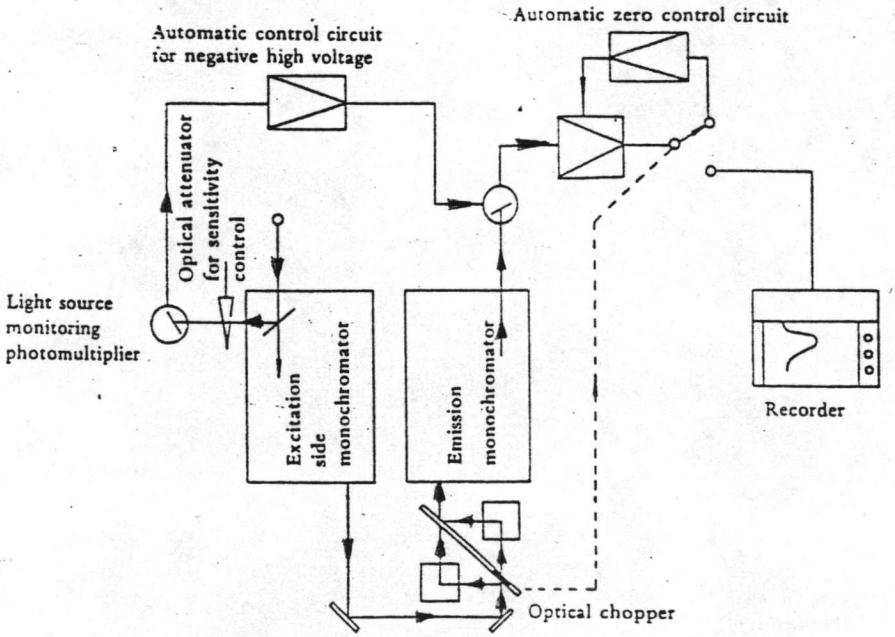
3.2.5.2 RF-520 Mainbody เป็นส่วนที่ประกอบด้วยเลนส์และแผ่นกรอง

แสงและเครื่องวัดแสง เพื่อให้ลำแสงถูกรวบรวมให้ผ่าน หลอดตัวอย่างไปยังเครื่องวัดลำแสง

3.2.5.3 Recorder เครื่องบันทึกผล



รูปที่ 3.2 แสดงเครื่อง Shimadzu Spectrofluorophotometer R520



รูปที่3.3 แสดงลักษณะการทำงานของเครื่อง Spectrofluorimeter

3.2.6 Volummetric Flask ปริมาตร 10,50,100 มิลลิลิตร

3.2.7 Albumin (human-fatty acid-free) บริษัท Sigma Chemical Co. Ltd.U.S.A. เตรียมสารละลายอัลบูมินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง 250 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งใน Volummetric Flask 50 มิลลิลิตร

3.2.8 Gamma-globulin (Rabbit.Cohn fraction II):บริษัท Sigma Chemical Co. Ltd. U.S.A. เตรียมสารละลายกลอบบินของกระต่าย ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง 250 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ใน Volummetric Flask 50 มิลลิลิตร

3.2.9 Gamma-globulin (Human.Cohn fraction II) : บริษัท Sigma Chemical Co. Ltd. U.S.A. เตรียมสารละลายกลอบบูลินของคน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง 250 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งใน Volummetric Flask 50 มิลลิลิตร

3.2.10 Cupric Chloride A.R.:บริษัท E.Merck,Germany. เตรียมสารละลายคิวปริคคลอไรด์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง 0.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งใน Volummetric Flask 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่เตรียมครั้งแรกมา 1 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งใน Volumetric Flask 100 มิลลิลิตร

3.2.11 Hydrogen peroxide: บริษัท Sigma Chemical Co. Ltd. U.S.A. เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร โดยดูด 1.13 มิลลิลิตรละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ใน Volummetric Flask 100 มิลิลลิตร แช่ในน้ำแข็ง(ice bath) ดูดสารละลายที่เตรียมได้ครั้งแรก 10 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งใน Volummetric Flask 100 มิลลิลิตร (แช่ในอ่างน้ำแข็ง)

3.2.12 1,1,4,4-Tetraphenyl-1,3-Butadiene A.R. : บริษัท Sigma Chemical Co. Ltd. U.S.A. เตรียมสารละลายความเข้มข้น 100 พิโคโมลาร์(10^{-7}โมลาร์) 1,1,4,4-Tetraphenyl-1,3-butadiene(MW 358.5) เตรียมสารละลายความเข้มข้น 10^{-2}โมลาร์ โดยชั่ง 35.85 มิลลิกรัม ละลายด้วย Tetrahydrofuran (THF). ใน Volummetric Flask 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายความเข้มข้น 10^{-4}โมลาร์ โดยดูดสารละลายที่เตรียม ได้ครั้งแรก 1 มิลลิลิตรละลายด้วย (THF) ใน Volummetric Flask 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ โดยดูดสารละลายที่เตรียมครั้งที่สองมา 0.1มิลลิลิตร ละลายด้วย THF ใน Volummetric Flask 100 มิลลิลิตร

3.2.13. Tetrahydrofuran (THF):บริษัท,Fluka,AG,AH-9470 Buchs. ใช้เป็นตัวละลายสารมาตราฐาน 1,1,4,4-Tetraphenyl-1,3-Butadiene

3.2.14 Di-Sodium Tetraborate (Borax) A.R.:บริษัท BDH Ltd.England เตรียมสารละลายบอแรกซ์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่ง 1.91 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ใน Volummetric Flask 100 มิลลิลิตร

3.2.15 Boric acid A.R.: บริษัท BDH Ltd. England เตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่ง 1.24 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ใน Volummetric Flask 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย Borate Buffer pH 9.5 โดยดูดสารละลาย 0.2 โมลาร์กรดโบริคมา 50 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.05 โมลาร์ บอแรกซ์มา 59 มิลลิลิตรละลายรวมกันด้วยน้ำกลั่นสองครั้งเติมลงใน Volummetric Flask 200 มิลลิลิตร

3.2.16 Nitric Acid:บริษัท BDH Ltd.England เตรียมสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้น 6 นอร์มาลใช้สำหรับแช่เครื่องแก้วที่ใช้ทั้งหมดค้างคืน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้งหลายๆครั้ง อบแห้ง

3.2.17 Thiourea (Thiocarbamide)A.R.:บริษัท BDH LTD.England เตรียม

สารละลาย 1.5 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง 1.14 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ใน Volummetric Flask 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายครั้งแรกมา 1 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในVolummetric Flask 100 มิลลิลิตร

3.2.18 Mannitol A.R. บริษัท BDH Ltd.England เตรียมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งมา 1.82 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งใน Volummetric Flask 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายครั้งแรกมา 1 มิลลิลิตรละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งใน Volummetric Flask 10 มิลลิลิตร

3.2.19 Haptoglobulin A.R. บริษัท Sigma Chemical Co. Ltd. U.S.A. เตรียมสารละลายแฮบโตกลอบบินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร โดยชั่งแฮบโตกลอบบินมา 0.5 มิลลิกรัมละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งใน volummetric flask 10 มิลลิลิตร

3.3 <u>วิธีการวิเคราะห์ปริมาณซีรัมแฮบโตกลอบบิน</u>

การตรวจวัดซีรัมแฮบโตกลอบบิน โดยซื้อชุดวิเคราะห์สำเร็จรูปจากบริษัท Behringซึ่งประกอบด้วยสารมาตราฐานแฮบโตกลอบบิน และสารแอนติบอดีต่อแฮบโตกลอบบินของคน ก่อนลงมือวิเคราะห์ ต้องนำน้ำยาชุดวิเคราะห์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้อุณหภูมิของน้ำยาเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำเอาขวดซีรัมตัวอย่างออกจากตู้เย็นอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อให้ซีรัมละลายที่อุณหภูมิห้องหลังจากซีรัมละลายดีแล้ว เขย่าขวดหลายๆครั้งเพื่อให้ซีรัมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมหลอดแก้วทดลองเท่ากับจำนวนซีรัมตัวอย่างที่จะทำแต่ละครั้ง แล้วทำตามการทดลองดังต่อไปนี้

3.3.1 ดูดซีรัมจากขวดซีรัมตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรลงในหลอดแก้ว

3.3.2 ดูดน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วทุกหลอด

3.3.3 เขย่าสารละลายในหลอดทดลองด้วยเครื่อง Mixer เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.3.4 ดูดสารละลายข้างต้นมา 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดแก้วพิเศษ Cuvette ที่อยู่ในเครื่อง

3.3.5 เติมสารละลายแอนติบอดีต่อแฮบโตกลอบบินใน 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดแก้วพิเศษ ทิ้งไว้ 30 วินาที เครื่องจะอ่านค่า V_{max} และ t_{vmax}ของซีรัมตัวอย่าง เก็บไว้ในหน่วยความจำของเครื่อง แล้วเครื่องจะคำนวณปริมาณแฮบโตกลอบบินที่มีอยู่ในซีรัมตัวอย่างออกมาทางเครื่องบันทึก

3.4 <u>วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออเรสเซนต์</u>

เริ่มต้นด้วยการตั้งเครื่อง Spectrofluorophotometer (RF-520) โดยเปิดสวิชทั้ง 3 ส่วนเพื่อ warm เครื่องประมาณ 2 นาที โดยใช้สารละลายมาตราฐานความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ของ Quinine sulfate ละลายในความเข้มข้น 0.1 นอร์มาล H_2SO_4 ใส่ลงใน cell เพื่อตั้งตามมาตราฐานของเครื่อง โดยตั้ง excitation wavelength ที่ 350 นาโนมิเตอร์ และ Excitation bandwidth ที่ 10 นาโนมิเตอร์ ตั้ง Emission wavelength ที่ 450 นาโนมิเตอร์ และ Emission bandwidth ที่ 10 นาโนมิเตอร์ โดยใช้สารละลาย 0.1 นอร์มอล H_2SO_4 เป็น Solvent blank อ่าน Fluorescence Intensity ได้เท่ากับ 40 เพื่อให้ได้ Maximum Sensitivity หลังจากนั้นนำเอาสารละลายความเข้มข้น 10^{-7}โมลาร์ 1,1,4,4-Tetraphenyl-1,3-butadiene มาตั้งเครื่อง โดยตั้ง Excitation wavelength ที่ 350 นาโนมิเตอร์ ตั้งEmission wavelength ที่ 440 นาโนมิเตอร์ อ่าน Fluorescence Intensity โดยใช้ Tetrahydrofuranเป็น solvent blank ได้เท่ากับ 41.2 จากเครื่องโดยใช้ Gain 10 แล้วทำเป็น 100 Unit Relative Fluorescence Intensity

แล้วทำการเติมสารละลายลงในหลอดทดลองต่อไปนี้ตามตารางที่ 3.1

สารละลายที่อยู่ในหลอดทดลอง	โปรตีน มิลลิลิตร	H_2O_2 มิลลิลิตร	H_2O_2 มิลลิลิตร	$CuCl_2$ มิลลิลิตร	mannitol มิลลิลิตร	thiourea มิลลิลิตร	haptoglobin มิลลิลิตร
1. โปรตีน (อัลบูมิน R-กลอบบูลิน H-กลอบบูลิน)	1.5	2.7	-	-	-	-	-
2. โปรตีน + สารละลาย H_2O_2	1.5	2.7	0.6	-	-	-	-
3. โปรตีน + สารละลาย $CuCl_2$	1.5	2.7	-	0.6	-	-	-
4. โปรตีน + สารละลาย H_2O_2 + $CuCl_2$	1.5	2.7	0.6	0.6	-	-	-
5. โปรตีน + H_2O_2 + $CuCl_2$ + mannitol	1.5	2.7	0.6	0.6	0.6	-	-
6. โปรตีน + H_2O_2 + $CuCl_2$ + thiourea	1.5	2.7	0.6	0.6	-	0.6	-
7. โปรตีน + H_2O_2 + $CuCl_2$ + Haptoglobin	1.5	2.7	0.6	0.6	-	-	0.6

ตารางที่3.1 แสดงปริมาตรของสารละลายในการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออเรสเซนต์

3.4.1 เติมสารละลายอัลบูมิน , R-กลอบบูลิน , H-กลอบบูลิน ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ล้างด้วยกรดไนตริกและน้ำกลั่นสองครั้ง

3.4.2 เติมน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอดทดลอง

3.4.3 เติมสารละลายแมนนิทอล ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.4.4 เติมสารละลายไธโอยูเรีย ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.4.5 เติมสารละลายแฮบโตกลอบบิน ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.4.6 เติมสารละลายคิวปริกคลอไรด์ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.4.7 เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.4.8 เขย่าสารละลายในหลอดทดลองด้วยเครื่อง Mixer

3.4.9 นำเอาหลอดทดลองทุกหลอดใส่ในอ่างน้ำของตู้แช่อุณหภูมิ (Water bath) 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วนำออกมา

3.4.10 นำเอาสารละลายทั้งหมดในหลอดทดลองไปวัดปริมาณ Fluorescence Intensity ของ Native Fluorescence โดยตั้ง Excitation wavelength ช่วง 267-294 นาโนมิเตอร์ (Maximum 298 นาโนมิเตอร์) Emission wavelength ช่วง 337-347 นาโนมิเตอร์ (Maximum ที่ 338 นาโนมิเตอร์) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Solvent blank แล้ววัดปริมาณ Fluorescence Intensity ของ Blue Fluorescence โดยตั้ง Excitation wavelength ที่ 300 นาโนมิเตอร์ และ Emission wavelength ที่ 450 นาโนมิเตอร์ เมื่อวัดปริมาณฟลูออเรสเซนต์ เสร็จแล้ว

3.4.11 เติมสารละลาย Borate buffer ปริมาตร 3มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่าเพื่อให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาวัด Fluorescense Intensity ของ Alkaline Fluorescence โดยตั้ง Excitation wavelength ที่ 327 นาโนมิเตอร์ Emission wavelength 400 นาโนมิเตอร์

3.5 การคำนวณค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนต์สัมพัทธ์ (Relative Fluorescence Intensity)

เนื่องจากใช้สารละลายความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ ของ 1,1,4,4-Tetraphenyl-1,3-butadiene เป็นสารละลายมาตราฐานเพื่อให้ได้ Fluorescence Intensity เท่ากับ 100 Units เมื่ออ่านค่าของ Fluorescence Intensity ของโปรตีนชนิดต่างๆได้ จะต้องคูณด้วยแฟคเตอร์ 2.427 ($\frac{1000}{41.2}$)

$$\text{Relative Fluorescence Intensity ของความเข้มข้นใหม่} = \frac{I \star X}{Y} \text{ Unit}$$

ให้ Gain ของความเข้มข้น 100 Unit = X

เมื่อวัดความเข้มข้นใหม่ได้ Fluorescence Intensity = I

Gain = Y

ตัวอย่าง

สารละลายความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ 1,1,4,4-Tetraphenyl-1,3-butadine มี Relative Fluorescence Intensity = 100 Unit โดยตั้ง Gain = 10

ตัวอย่างสารละลายอัลบูมินตั้ง Gain = 2 มี Fluorescence Intensity = 54.3

$$\text{Relative Fluorescence Intensity} = \frac{54.3 \star 10 \star 2.427}{2}$$

$$= 658.9$$