หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. สารเคมี

Theophylline และ 2,2-oxybis (ethylamine) จาก Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Ethyl-4-bromobutyrate, Ethyl-5-bromovalerate, *N*-hydroxysuccinimide, Sodium borohydride, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Horseradish peroxidase, Sodium metaperiodate, Trinitrobenzene sulfonic acid, Bovine Serum Albumin, 4,5-Diamino-1,3-dimethylpyrimidine-2,6-dione, Glutaric anhydride, N,N-dimethylaniline, Adipic acid monoethyl ester จาก Sigma Chemical Company (Montana, USA) *O*-phenylenediamine จาก Zymed Laboratories, INC (SF, USA). Complete Freund's adjuvant และ Incomplete Freund's adjuvant จาก Ditco (Detroit, Mich., USA.) Sodium acetate, Sodium bicarbonate, Sodium chloride, Sodium dihydrogenphosphate, Disodium hydrogen phosphate, Tween 20, Dimethylformamide, Ethanol, Ethyl acetate, Chloroform, Methanol, Hydrochloric acid, Sulfuric acid, Glacial acetic acid, Hydrogen peroxide, Tributylamine, Isobutyl chloroformate จาก E. Merck Damstadt, Germany. Thimerosal จาก Keck's (San Fransico, USA.)

2. สัตว์ทดลอง

กระต่ายพันธุ์ Newzealand white rabbit เพศเมีย น้ำหนัก 2.0 - 3.0 กิโลกรัม 8 ตัว จากภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

Ultraviolet Spectrophotometer (Spectronic'3000 Array, Milton Roy Co.) USA; Infrared Spectrophotometer, (Perkin-Elmer model FT-IR) CT, USA.; Nuclear

Magnetic Resonance Spectrophotometer (Model JNM-500, Jueol limited) Japan; Buchi Capillary Melting point apparatus (Nach Dr. Tottoli, Buchi) Switzerland; Analytical Balance (Satorious type, WRC 6001, Satorious-Werke GMBH) Germany; pH-meter (Consort pH meter electrochemical multimeter) Germany; Vortex mixer (Vortex Genei, Scientific Industries Inc.) New York, USA.; Centrifuge (Hetlich zentrifugen, EBA12) Germany; Micropipet (Socorex) USA; Microplate reader (ELISA plate reader, Bio-Rad Model 3550, Bio-Rad Laboratories) USA.; Freezed dryer (Dura-Dry) New York, USA.

วิธีการทดลอง

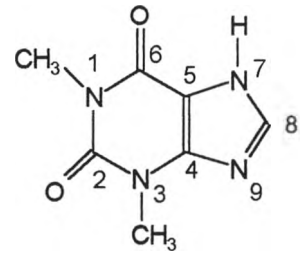
1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของธิโอฟิลลีน
2. การเตรียมอิมมูโนเจนของอนุพันธ์ธิโอฟิลลีน
3. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี
4. การเตรียมธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส
5. การติดฉลากธิโอฟิลลีนด้วยเอ็นไซม์
6. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดการแย่งที่ (competition) ระหว่างธิ โอฟิลลีนติดฉลาก และสารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน
7. การศึกษาผลของ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างสารติดฉลากธิโอฟิลลีนกับอิมมูโนเจน

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของธิโอฟิลลีน

การสร้างอิมมูโนเจนหรือตัวติดฉลากเอ็นไซม์จากธิโอฟิลลีนต้องมีการเตรียมธิโอฟิลลีนให้สามารถจับกับหมู่อะมิโน (amino group) ของเอ็นไซม์หรือของโปรตีนในขั้นตอนเตรียมตัวติดฉลากหรืออิมมูโนเจนได้

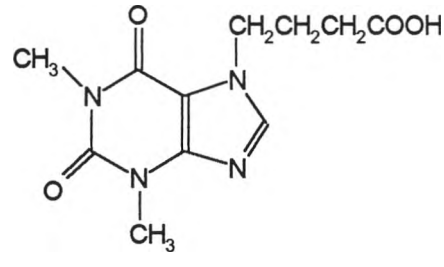
การศึกษานี้ได้เตรียมอนุพันธ์ธิโอฟิลลีน 4 ตัว ซึ่งต่างกันที่ตำแหน่งสายโซ่ (site chain) หรือความยาวของสายโซ่ (bridge chain)เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของแอนติบอดีที่เกิดจากอนุพันธ์แต่ละตัว ตามหลักการของไซท์ เฮเทอโรโลกัส และ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน โดยสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของธิโอฟิลลีนจะได้แสดงต่อไปนี้

สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของธิโอฟิลลีน(1,3-dimethylxanthine)

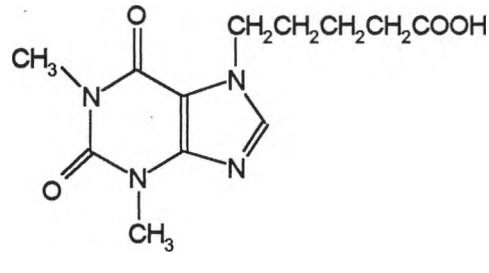


อนุพันธ์ธิโอฟิลลีนที่ต้องการสังเคราะห์

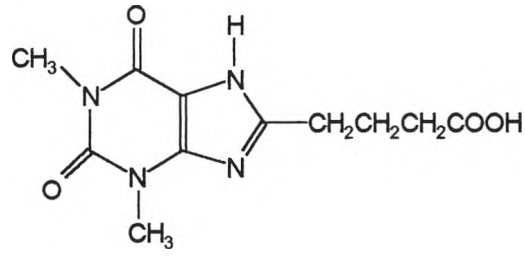
อนุพันธ์ ก. 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine



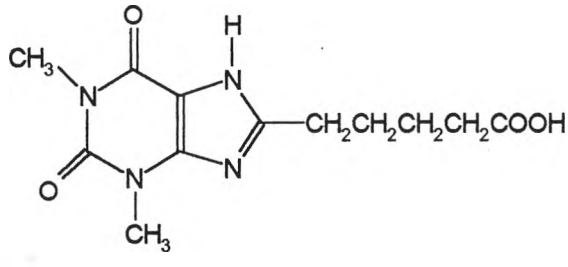
อนุพันธ์ ข. 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine



อนุพันธ์ ค. 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine



อนุพันธ์ ง. 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine



1.1 การสังเคราะห์ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) (Hu and Singh,1980)

ผสม Theophylline 18.0 กรัม (0.1โมล) , sodium carbonate 21.5 กรัม (0.2 โมล) และ ethyl-4-bromobutyrate 39.0 กรัม (0.2 โมล) ใน dimethylformamide (DMF) 20 มิลลิลิตร แล้ว กวนที่อุณหภูมิห้องนาน 18 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำและสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม นำชั้นคลอโรฟอร์มมาล้างด้วยน้ำ ระเหยคลอโรฟอร์มด้วยเครื่องกลั่นระเหยรวดเร็วภายใต้ความกดดันต่ำชนิดหมุนได้ (rotary evaporator) ได้ของเหลวคล้ายน้ำมันสีเหลือง เติม 10% HCl แล้วอุ่นให้ร้อนที่ 80-90°ซ นาน 45 นาที ล้างด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง จะได้อนุพันธ์ ก. ในชั้นน้ำ นำมาทำการตกผลึกซ้ำในน้ำได้ผลึกรูปเข็มสีขาวของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) หนัก 15.2 กรัม คิดเป็น 57% เป็น โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 176-177°ซ สารที่ได้นี้จะต้องนำไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ ก. โดยวิธีการทาง IR และ NMR ต่อไป

1.2 การสังเคราะห์ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) (Hu and Singh,1980)

ผสม Theophylline 18.0 กรัม (1.0 โมล), sodium carbonate 21.5 กรัม (0.2 โมล) และ Ethyl-5-bromovalerate 41.8 กรัม (0.2 โมล) ใน DMF 20.0 มิลลิลิตร แล้วกวนที่อุณหภูมิห้องนาน 18 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำและสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม นำชั้นคลอโรฟอร์มมาล้างด้วยน้ำ ระเหยคลอโรฟอร์มด้วยเครื่องกลั่นระเหยรวดเร็วภายใต้ความกดดันต่ำชนิดหมุนได้ ได้ของเหลวคล้ายน้ำมันสีเหลือง เติม10% HCl อุ่นให้ร้อนที่ 80-90°ซ นาน 45 นาที ล้างด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง สารที่ต้องการจะอยู่ในชั้นน้ำ นำมาทำการตกผลึกซ้ำในน้ำได้ผลึกรูปเข็มสีขาวของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ข.)หนัก 4.5 กรัม คิดเป็น16% โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 108-110°ซ พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยวิธีการทาง IR และ NMR ต่อไป

1.3 การสังเคราะห์ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) (Cook et al.,1976)

รีฟลักซ์ (reflux) 4,5-diamino-1,3-dimethylpyrimidine-2,6-dione 3.3 กรัม (0.2 โมล) และ glutaric anhydride 4.5 กรัม (0.4 โมล) เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ใน *N,N*-dimethyl aniline 30 มิลลิลิตร ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ Dean-Stark trap ดักน้ำ เติม *N,N*-dimethyl aniline อีก 20 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ต่ออีกครึ่งชั่วโมง ปล่อยให้ของผสมเย็น นำมากรอง ล้างตะกอนด้วยเบนซีน ทำการตกผลึกซ้ำในน้ำ ได้ของผงตะกอนสีเหลืองอ่อน หนักของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) 1.78 กรัม คิดเป็น 36.40% คาดว่าเป็นโดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 232-235° พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยวิธีการทาง IR และ NMR ต่อไป

1.4 การสังเคราะห์ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) (Daly et al.,1985;Kim et al.;1994)

ผสม 4,5-diamino-1,3-dimethylpyrimidine-2,6-dione 10.5 กรัม (0.06 โมล), 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride 11.5 กรัม (0.06 โมล) และ Adipic acid monoethyl ester 10.5 กรัม (0.06 โมล) ใน

DMF 20 มิลลิลิตร กวนของผสมที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง ได้สารละลายใสสีเหลือง นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทธานอล ในอัตราส่วน 9:1 เป็นตัวชะ (eluent) หลังจากระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยรวดเร็วภายใต้ความกดดันต่ำชนิดหมุนได้จะได้ผงตะกอนสีขาว นำตะกอนที่ได้มารีฟลักซ์ใน 2N NaOH 1 ชั่วโมง ปรับ pH สารละลายที่ได้ให้เป็นกลางด้วย 10% HCl ตั้งไว้ให้ตกผลึกที่อุณหภูมิห้อง ได้ผงตะกอนสีขาว 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine(อนุพันธ์ ง.) หนัก0.63 กรัม คิดเป็น 4%โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 238-240°ซ พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยวิธีการทาง IR และ NMR ต่อไป

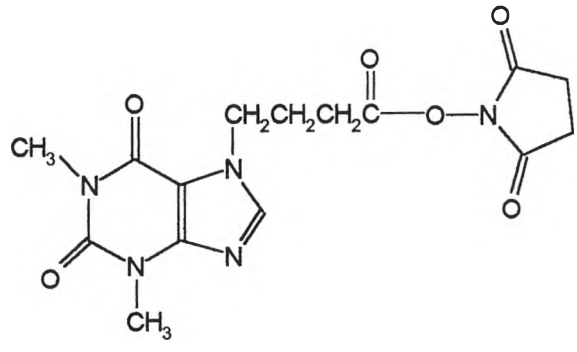
2. การเตรียมอิมมูโนเจนของอนุพันธ์ธิโอฟิลลีน

2.1 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ก.)

การเตรียม *N*-hydroxysuccinimide เอสเทอร์ของ7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine

เติม 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride 4.6 กรัม (0.02 โมล) และ *N*-hydroxysuccinimide 2.8 กรัม (0.02 โมล) ลงในสารละลายของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 4.2 กรัม (0.02 โมล) ใน DMF 15 มิลลิลิตร ผสมที่ 0°ซ จนได้สารละลายใส แล้วนำมากวนที่ 4°ซ นาน 40 ชั่วโมง ได้ตะกอนขาวเกิดขึ้น กรอง ล้างด้วยเมทธานอล ทำตะกอนให้แห้งในสูญญากาศ ได้ผงตะกอนสีขาว 3.6 กรัม คิดเป็น 62.15%ซึ่งเป็น NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl-1,3-dimethylxanthine โดยมีจุดหลอมเหลวที่ 215-216°ซ พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วย IR และ NMR ต่อไป

สูตรโครงสร้างของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine



ค่อยๆ เติมสารละลายของ NHS เอสเทอร์ของ7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 1.7 กรัม (6.0 x 10^{-3}โมล) ละลายใน DMF 15.0 มิลลิลิตร ลงในสารละลายของ BSA 7.0 กรัม (1.0 x 10^{-4}โมล) ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) 40.0 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ ที่ 4°ซ นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำของผสมมาทำไดอะไลซ์ (dialyse) ใน PBS pH 7.0 ที่ 4°ซ จน NHS เอสเทอร์ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ที่ไม่ได้จับกับBSA หมดไป นำของเหลวนั้นมาทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry)ได้อิมมูโนเจน ก. หนัก 15.2 กรัม

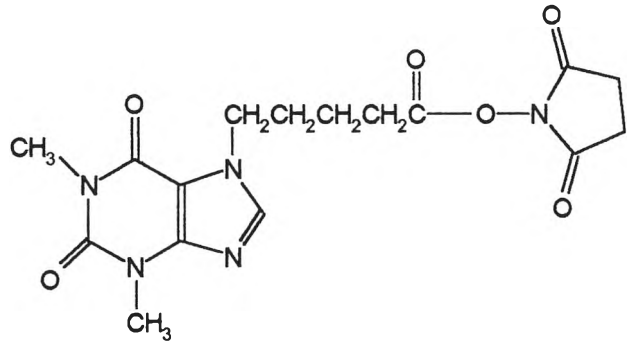
จากอิมมูโนเจน ก.ที่ได้นำไปหาจำนวนอนุพันธ์ ก.ที่ติดกับ BSAโดยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

2.2 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ข.)

การเตรียม *N*-hydroxysuccinimide เอสเทอร์ของ7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine

เติม 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride 7.3 กรัม (3.82 มิลลิโมล) และ *N*-hydroxysuccinimide 0.43 กรัม (3.75 มิลลิโมล) ลงใน 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine 7.1 กรัม (0.025 โมล) ใน DMF 25.0 มิลลิลิตร ผสมกัน 0°ซ จนได้สารละลายใสแล้วนำมากวนที่ 4°ซ นาน 40 ชั่วโมงได้ตะกอนขาวเกิดขึ้นทำการกรองล้างด้วยเมทธานอลทำตะกอนให้แห้งในสูญญากาศได้ผงตะกอนสีขาว 3.2 กรัมคิดเป็น 34.56% ซึ่งเป็น NHSเอสเทอร์ของ7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 164-165°ซ พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดย IR และ NMR

สูตรโครงสร้างของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine



ค่อยๆ เติม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 0.23 กรัม (0.6 มิลลิโมล) ละลายใน DMF 15.0 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้ลงในสารละลายของ BSA 0.70 กรัม (0.01 มิลลิโมล) ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์(pH 9.5) 40.0 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ ที่ 4°ซ นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำของผสมมาทำไดอะไลซ์ใน PBS pH 7.0 ที่ 4°ซ จน NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ที่ไม่ได้จับกับBSAหมดไป นำของเหลวนั้นมาทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ได้อิมมูโนเจน ข. หนัก 1.64 กรัม

จากอิมมูโนเจน ข.ที่ได้นำไปหาจำนวนอนุพันธ์ ข.ที่ติดกับ BSA โดยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

2.3 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ค.)

เติม Tri-n-butylamine 1.5 มิลลิลิตร (6.0×10^{-3}โมล) ลงในสารละลาย 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 1.6 กรัม (6.0×10^{-3}โมล) ใน DMF 60.0 มิลลิลิตร กวนจนเป็นสารละลายสีเหลืองใสแล้วทำให้เย็นที่ 4°ซ จากนั้นเติม Isobutyl chloroformate 1.0 มิลลิลิตร (7.6×10^{-3}โมล) และกวนให้เข้ากันที่ 4°ซ นาน 50 นาที ค่อย ๆ เติมของผสมที่ได้ลงในสารละลายของ BSA 7.0 กรัม (1.0×10^{-4}โมล) ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์(pH 9.5) 30.0 มิลลิลิตร และกวนของผสมนาน 4 ชั่วโมง ณ 4°ซ นำของผสมที่ได้มาไดอะไลซ์ในน้ำจน 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ที่ไม่ได้จับกับ BSA หมดไป จากนั้นนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง ได้อิมมูโนเจน ค. หนัก 5.5 กรัม

จากอิมมูโนเจน ค.ที่ได้นำไปหาจำนวนอนุพันธ์ ค.ที่ติดกับ BSAโดยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

2.4 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ง.)

เติม Tri-n-butylamine 1.5 มิลลิลิตร (6.0×10^{-3} โมล) ลงในสารละลายของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine 1.7 กรัม (6.0×10^{-3} โมล) ใน DMF 60.0 มิลลิลิตรกวนจนเป็นสารละลายใส แล้วทำให้เย็นที่ 4°ซ จากนั้นเติม Isobutyl chloroformate 1.0 มิลลิลิตร (7.6×10^{-3} โมล) กวนให้เข้ากันที่ 4°ซ นาน 50 นาที ค่อย ๆ เติมของผสมที่ได้ลงในสารละลายของ BSA 7.0 กรัม (1.0×10^{-4} โมล) ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ (pH 9.5) 30.0 มิลลิลิตร กวนของผสมนาน 16 ชั่วโมง ณ 4°ซ นำของผสมที่ได้มาไดอะไลซ์ในน้ำจน 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ที่ไม่ได้จับกับ BSA หมดไป หลังจากนั้นนำมาทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ได้อิมมูโนเจน ง. หนัก 6.8 กรัม

จากอิมมูโนเจน ง.ที่ได้นำไปหาจำนวนอนุพันธ์ ง.ที่ติดกับ BSA โดยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

3. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีสำหรับธิโอฟิลลีน

การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีใช้กระต่ายพันธุ์ Newzealand White Rabbit เพศเมีย น้ำหนัก 2.0-3.0 กิโลกรัม โดยใช้กระต่าย 2 ตัว สำหรับอนุพันธ์ 1 ตัว ทำการฉีดอิมมูโนเจนในรูปอีมัลชัน(โดยใช้ ฟรอยด์ แอดจูแวนท์)1 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายในช่วงเวลาต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 และตรวจหาการเกิดแอนติบอดีในซีรัม ภายในระยะเวลา 40-60 วัน แล้วแต่ชนิดของอิมมูโนเจน

ตารางที่ 1 ตารางการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย

อิมมูโนเจน ก.		อิมมูโนเจน ข.		อิมมูโนเจน ค.		อิมมูโนเจน ง.	
วัน	ความเข้มข้น (มก./มล.) ในฟรอยด์แอดจูแวนท์	วัน	ความเข้มข้น (มก./มล.) ในฟรอยด์แอดจูแวนท์	วัน	ความเข้มข้น (มก./มล.) ในฟรอยด์แอดจูแวนท์	วัน	ความเข้มข้น (มก./มล.) ในฟรอยด์แอดจูแวนท์
0*	1.0	0*	1.0	0*	2.0	0*	2.0
14	1.0	14	1.5	12	2.0	14	2.0
29	1.5	28	1.5	34	3.0	28	3.0
43	2.0	46	2.0	47	3.0	42	3.0
57	2.0	61	2.0	-	-	-	-

* : ในวันที่ 0 จะใช้ Complete Freund's Adjuvant ส่วนวันอื่น ๆ ใช้ Incomplete Freund's Adjuvant

Complete Freund's Adjuvant (mineral oil + *M. butyricum*)

Incomplete Freund's Adjuvant (mineral oil)

อิมมูโนเจน ก. = อิมมูโนเจนของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine
อิมมูโนเจน ข. = อิมมูโนเจนของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine
อิมมูโนเจน ค. = อิมมูโนเจนของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine
อิมมูโนเจน ง. = อิมมูโนเจนของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine

จากแอนติซีรัมที่ได้นำไปหาไตเตอร์(Titer) โดยวิธี direct ELISA ใน 1 หลุมของไมโครเพลท เคลือบด้วยแอนติซีรัมที่เจือจางด้วย PBS-T pH 7.4 (ซึ่งมี tween 20 0.05%) ให้อยู่ระหว่าง 1:10 - 1:100,000 โดยเก็บไว้ที่ 4°ซ ทิ้งค้างคืน ล้างแอนติซีรัมที่เหลือออกด้วย PBS-T เติม BSA 3% w/v ใน PBS-T pH 7.4 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS-T เติมธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 °ซ 2 ชั่วโมง ล้างสารติดฉลากที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดี ด้วย PBS-T เติม OPD (*O*-Phenylenediamine-Hydrogen peroxide) ในซิเตรท/ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติม สารละลาย 4 N H_2SO_4 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

วัดการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซนต์การจับ(% Binding) ของสารติดฉลากกับแอนติซีรัมดังสมการ

$$\% \text{ การจับ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละสารละลายเจือจาง} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด}}$$

สร้างเส้นกราฟที่อัตราส่วนความเจือจางต่างๆ ของแอนติซีรัมกับ %การจับที่ค่าอัตราส่วนความเจือจางที่ทำให้มีการจับของสารติดฉลากกับแอนติซีรัม 50% คือค่าไตเตอร์ (titer)ของแอนติซีรัม

การหาไตเตอร์ของแอนติซีรัมจะใช้สารติดฉลากที่มาจากอนุพันธ์เดียวกันกับอิมมูโนเจน

4. การเตรียมเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อการติดฉลาก

เติมสารละลาย 50.0 มิลลิลิตร ของ 0.1 Mโซเดียมเมตะเปอร์ริโอเดต (sodium metaperiodate) ลงในสารละลายของ HRP 5.0 กรัม (1.2×10^{-4} โมล) ใน 50.0 มิลลิลิตร ของ 0.01 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เติม 40.0 มิลลิลิตร ของ 0.1 M ของไกลเซอรอล (glycerol) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำของผสมที่ได้มาทำไดอะไลซ์ใน 0.1 M ของโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ที่ 4°ซ เพื่อแยกส่วนเกินของรีเอเจนต์ออกให้หมด

เติมของผสมข้างต้นใน 100.0 มิลลิลิตรของสารละลาย 1 M ของ 2,2′-oxybis (ethylamine) ใน 0.5 M โซเดียมคาร์บอเนตที่ปรับ pH เป็น 9.5 ด้วย 2 N NaOH กวนของผสมนี้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 4°ซ จากนั้นเติมสารละลายที่เตรียมใหม่ของ 1.0 M โซเดียม-บอโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) 50.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 4°ซ ไดอะไลซ์ของผสมที่ได้ใน 0.1 M โ ซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.5 ที่ 4°ซ เพื่อแยกรีเอเจนต์ที่เหลือออกให้หมด ของผสมที่ได้นำมาทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ผงสีน้ำตาล หนัก 9.1 กรัม หาจำนวนหมู่อะมิโนที่จับกับ HRP โดยทำปฏิกิริยากับ Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) แล้ววัดโดยใช้ UV spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 354 นาโนเมตร(Wilson and Nakane, 1978)

5. การติดฉลากธิโอฟิลลีนด้วยเอ็นไซม์

5.1 การติดฉลากของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ (สารติดฉลาก ก.)

ค่อยๆ เติม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (จากข้อ 2.1) 0.64 กรัม (1.7×10^{-3} โมล) ใน DMF 20.0 มิลลิลิตร ลงในสารละลายของ HRP (ที่เตรียมได้จากข้อ 4) 2.5 กรัม ใน 0.1 M ของโซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 9.5 25.0 มิลลิลิตร คนเบา ๆ และกวนที่ 4°ซ นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นไดอะไลซ์ ใน PBS pH 7.0 เพื่อแยกส่วนที่ไม่ได้จับกับ HRP ออกไป นำของเหลวที่ได้มาทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ผงสีน้ำตาลเบาหนัก 7.7 กรัม

นำมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเอ็นไซม์และหาจำนวนโมลของธิโอฟิลลีนที่ติดฉลากกับเอ็นไซม์ด้วยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

5.2 การติดฉลากของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ (สารติดฉลาก ข.)

NHS เอสเทอร์ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (จากข้อ 2.2) 0.76 กรัม (2.0×10^{-3} โมล) ใน DMF 20.0 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมลงในสารละลายของ HRP ที่เตรียมได้จากข้อ 4 1.6 กรัม ใน 20.0 มิลลิลิตร ของ 0.1 M ของโซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 9.5 คนเบา ๆ กวนที่ 4°ซ นาน 16 ชั่วโมง ไดอะไลซ์ ใน PBS pH 7.0 เพื่อแยกส่วนที่ไม่ได้จับกับเอ็นไซม์ออกไป นำของเหลวที่ได้มาทำแห้งแบบเยือกแข็ง ได้ผงสีน้ำตาลเบา หนัก 3.6 กรัม

นำมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเอ็นไซม์และหาจำนวนโมลของธิโอฟิลลีนที่ติดฉลากกับเอ็นไซม์ด้วยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

5.3 การติดฉลากของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ (สารติดฉลาก ค.)

เติม Tri-n-butylamine 15.0 มิลลิลิตร (0.06×10^{-3} โมล) ลงใน 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 16.0 กรัม (0.06×10^{-3} โมล) ใน DMSO 30.0 มิลลิลตรกวนจนเป็นสารละลายแล้วทำให้เย็นที่ 4°ซ ค่อยๆ เติม Isobutylchroroformate 10.0

มิลลิลิตร (0.076 โมล) กวนให้เข้ากันที่ 4°ซ เป็นเวลา 50 นาที แล้ว ค่อย ๆ เติมของผสมที่ได้ลงในสารละลายที่เย็นของเอ็นไซม์ HRP (ที่ได้จากข้อ 4) 21.0 กรัมใน0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 9.5 ปริมาณ 15.0 มิลลิลิตร กวนของผสมนี้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วไดอะไลซ์ใน PBS pH 7.0 เพื่อแยกส่วนที่ไม่จับกับ HRP ออกไป แล้วทำให้แห้งแบบเยือกแข็งได้ผงสีน้ำตาลเบา หนัก 3.8 กรัม

นำสารที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเอ็นไซม์และหาจำนวนโมลของธิโอฟิลลีนที่ติดฉลากกับเอ็นไซม์ด้วยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

5.4 การติดฉลากของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ (สารติดฉลาก ง.)

เติม Tri-n-butylamine 15.0 มิลลิลิตร(0.06โมล) ลงในสารละลาย 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine 17.0 กรัม (0.06โมล) ใน DMSO 30.0 มิลลิลิตรกวนจนเป็นสารละลายแล้วทำให้เย็นที่ 4°ซ ค่อยๆ เติม Isobutylchloroformate 10.0 มิลลิลิตร (0.076โมล) กวนให้เข้ากันที่ 4°ซ เป็นเวลา 50 นาที ค่อย ๆ เติมของผสมที่ได้ลงในสารละลายที่เย็นของเอ็นไซม์ HRP (ที่ได้จากข้อ 4) 20.0 กรัมใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 9.5 ปริมาณ 15.0 มิลลิลิตร กวนของผสมนี้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วไดอะไลซ์ใน PBS pH 7.0 เพื่อแยกส่วนที่ไม่จับกับ HRP ออกไป ทำให้แห้งแบบเยือกแข็งได้ผงสีน้ำตาลเบา หนัก 31.0 กรัม

นำสารที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเอ็นไซม์และหาจำนวนโมลของธิโอฟิลลีนที่ติดฉลากกับเอ็นไซม์ด้วยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

6.การกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับสารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดี

จากแอนติซีรัมและสารติดฉลากของอนุพันธ์ของธิโอฟิลลีนทั้ง 4 ตัว ได้นำหลักการทางอิมมูโนแอสเสย์มาใช้ในการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับธิโอฟิลลีนเพื่อจับกับแอนติบอดีนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาอาจแตกต่างกันในอนุพันธ์แต่ละตัวที่เตรียมขึ้นจึงต้องศึกษาเพื่อกำหนดสภาวะที่ปฏิกิริยาการแย่งที่เกิดและวิเคราะห์ได้ ดังนี้

เตรียมสารละลายของแอนติบอดีและธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ให้มีค่าความเข้มข้นต่างกัน 4-5 ค่า โดยใช้เทคนิคของ competitive ELISA โดยใช้สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีนในความเข้มข้น 0-40 มก.ต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมที่เกิดปฏิกิริยาการแย่งที่จะเป็นสภาวะที่ผลการแย่งที่แปรตามค่าความเข้มข้นของธิโอฟิลลีนซึ่งประเมินจากการสร้าง logic plot ระหว่างค่าการจับของธิโอฟิลลีนกับความเข้มข้นในเทอมของ log ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ให้ค่าของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากที่สุด จะถูกเลือกเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (Standefer and Saunders, 1978)

7. การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับอิมมูโนเจน

ธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ และแอนติบอดีจากอนุพันธ์ทั้ง 4 ตัว ที่มีความแตกต่างกันที่ตำแหน่งของสายโซ่หรือความยาวของสายโซ่นำมาศึกษาถึงผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันระหว่างสารติดฉลากธิโอฟิลลีนและแอนติบอดีต่อความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์ โดยศึกษาตามลักษณะต่างๆของเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน 16 ลักษณะ ดังตารางต่อไปนี้

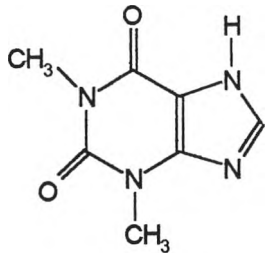
คอมบิเนชัน	สารติดฉลาก	อิมมูโนเจน
โฮโมโลกัส	ก.	ก.
	ข.	ข.
	ค.	ค.
	ง.	ง.
บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส	ก.	ข.
	ข.	ก.
	ค.	ง.
	ง.	ค.
ไซท์ เฮเทอโรโลกัส	ก.	ค.
	ค.	ก.
	ข.	ง.
	ง.	ข.
บริดจ์และไซท์ เฮเทอโรโลกัส	ก.	ง.
	ง.	ก.
	ข.	ค.
	ค.	ข.

เช่น จากธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ และแอนติบอดีของอนุพันธ์ ก. , ข. , ค. และ ง. เมื่อจับคู่ระหว่าง อนุพันธ์ ก. กับ ข. หรืออนุพันธ์ ค. กับ ง. จะเป็น บริดจ์เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน เมื่อจับคู่ระหว่างอนุพันธ์ ก. กับ ค. หรืออนุพันธ์ ข. กับ ง. จะเป็นไซท์เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน และเมื่อจับคู่ระหว่างอนุพันธ์ ก. กับ ง. หรืออนุพันธ์ ข. กับ ค. จะเป็นบริดจ์และไซท์เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน ดังตารางข้างต้น

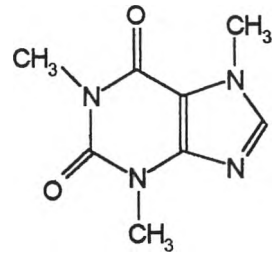
การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันแบบต่างๆ ทั้ง 16 ลักษณะ จะใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแย่งที่ ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับสารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดีที่ได้จากข้อ 6 และใช้เทคนิค competitive ELISA ทำนองเดียวกับข้อที่ 6 โดยใช้สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีนในความเข้มข้น 0-40 มก.ต่อลิตร

เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันที่เหมาะสมที่สุดจะให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(r) ที่ได้จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ logic plot ระหว่างค่าการจับของธิโอฟิลลีนกับความเข้มข้นของธิโอฟิลลีนในเทอมของ log ที่สูงสุด โดยค่าความชัน (slope) ของเส้นกราฟจะบอกถึงความไวของการวิเคราะห์

ส่วนความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ จะใช้คาเฟอีนเป็นสารตรวจความจำเพาะ เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างเป็น xanthine เช่นเดียวกับธิโอฟิลลีน แต่ต่างกันเพียงตำแหน่งที่ 7 โดยคาเฟอีน มีหมู่เมธิล ($-CH_3$)มาต่อ ดังแสดงในรูป



ธิโอฟิลลีน



คาเฟอีน

ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ คำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์ของการเกิดปฏิกิริยาข้าม (% cross reactivity) ของคาเฟอีนต่อแอนติบอดีของธิโอฟิลลีน ดังสมการ

$$\%\ \text{cross reactivity} = \frac{\text{มก.ของธิโอฟิลลีน/ลิตร ที่ 50\% การจับ} \times 100}{\text{มก.ของคาเฟอีน/ลิตร ที่ 50\% การจับ}}$$

โดยเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันที่ให้ค่า %cross reactivityต่ำที่สุดถือว่ามีความจำเพาะเจาะจงสูงหรือมากที่สุด