บทที่ 3

วิธีการเตรียมสารที่ใช้ในการศึกษา

3.1. น้ำยาเพาะเลี้ยง ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง 2 ชนิด

3.1.1 BWW medium (Modified Krebs-Ringer's bicarbonate buffer) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Bigger, Whitten และ Whittingham ในปี 1971 จึงเรียกชื่อน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดนี้ว่า BWW ซึ่งจะใช้ในการเตรียมสารละลายเปอร์คอล การคาพาซิเตท อสุจิ การเตรียมไข่ และการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

3.1.2 Ham F-10 medium เป็น complex medium ใช้สำหรับเลี้ยงไข่หลังจากผ่านการปฏิสนธิแล้ว เพื่อดูอัตราการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ โดยดูจากโปรนิวเคลียส (pronucleus) ของอสุจิ และใช้เลี้ยงไข่เพื่อศึกษาโครโมโซมจากอสุจิต่อไป

น้ำยาเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด เตรียมด้วยน้ำกรองจากเครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านไฟฟ้า 18 เมกะโอห์ม-ซม. (conductivity 18 MΩ - cm) สำหรับน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW สามารถเตรียมขึ้นได้เองในห้องปฏิบัติการ ส่วนน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 เป็นผงสำเร็จรูป เวลาใช้จะนำมาเติม แคลเซียม แลคเตท โซเดียมไบคาร์บอเนต เพนนิซิลลิน จี สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต และโซเดียมไพรูเวท ตามต้องการ ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวต่อไป

3.1.3 น้ำมิลลิคิว เป็นน้ำที่มีค่าความต้านไฟฟ้า 18 เมกะโอห์ม-ซม. หรือมีค่าความบริสุทธิ์ 18 เมกะโอห์ม และต้องปราศจากไพโรเจน โดยเตรียมจากน้ำประปา ผ่านเครื่องกรองน้ำระบบ มิลลิ อาร์โอ แล้วเก็บในภาชนะนอนทอคซิค โพลีเอธิลีน สตอเรจแทงค์ (non toxic polyethylene storage tank) แล้วผ่านเครื่องกรองระบบน้ำมิลลิคิว ซึ่งมีชุดกรองให้ปราศจากสารไพโรเจนอยู่ด้วย ภาชนะสำหรับจะเก็บน้ำไปใช้นั้นต้องเป็นภาชนะแก้ว (pyrex) หรือพลาสติคที่ปราศจากเชื้อ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 18 เมกะโอห์ม และปราศจากไพโรเจน นี้จะใช้น้ำที่กรองออกจากเครื่องกรองมิลลิคิวใหม่ทุกครั้ง

3.2. การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

3.2.1 น้ำยาเพาะเลี้ยง BWW เนื่องจากองค์ประกอบของสารบางอย่างในน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW สำหรับขั้นตอนของการทดลองต่าง ๆ ไม่เหมือนกัน จึงแบ่งน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW เป็น 3 สูตรด้วยกัน คือ BWW สำหรับเตรียมสารละลายเปอร์คอล BWWสำหรับคาพาซิเตทอสุจิ และ BWW สำหรับเตรียมไข่และปฏิสนธิในหลอดแก้ว ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาและการนำมาใช้ แต่อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของสารเคมีส่วนใหญ่จะเหมือนกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร	มิลลิโมลาร์ (mM)
NaCl	5.540	94.80
KCl	0.356	4.77
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.189	1.29
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.294	1.19
KH_2PO_4	0.162	1.19
$NaHCO_3$	2.106	25.07
D-Glucose	1.000	5.54
Na lactate 60% syrup	3.7 มล.	19.7
Na pyruvate	0.028	0.25
streptomycin sulfate	0.050	37,750 หน่วยสากล
penicillin G	0.060	99,720 หน่วยสากล
saturated phenol red	5.0 มล.	
amphotericin B	250 ไมโครกรัม	

เพื่อความสะดวกในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษา ตลอดจนการนำมาใช้ จะแบ่งน้ำยา BWW ออกเป็น 3 ส่วน คือ BWW stockI BWW stockII และ supplement ซึ่งในขั้นตอนของการทดลองแต่ละอย่างจะใช้องค์ประกอบของสารใน BWW stockI และ BWW stockII เหมือนกัน แต่จะมีส่วนประกอบของ supplement ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบของ BWW stockI

ส่วนประกอบ	กรัมต่อ 500 มล.
NaCl	3.72113
KCl	0.2225
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1181
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.18563
KH_2PO_4	0.10125
Na lactate	2.313 มล.
saturated phenol red	3.125 มล.

ข้อควรระวัง สำหรับ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ แยกละลายในบีกเกอร์ต่างหากเพื่อป้องกันการตกตะกอนของ Ca^{2+}

การเก็บรักษา เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

สำหรับ BWW stockII เป็นสารละลายของเกลือ $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 0.2106 กรัมต่อ 20 มล. ซึ่งต้องเตรียมสดทุกครั้งที่ใช้

ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบของ supplement สำหรับการคาพาซิเตทอสุจิและปรับความเข้มข้นของอสุจิ

ส่วนประกอบ	กรัมต่อสารละลาย BWW 100 มล.
sodium pyruvate	0.0028
penicillin G	0.006
streptomycin sulfate	0.005
amphotericin B	25 ไมโครกรัม
cafeine	0.1942

วิธีเตรียมสารละลาย BWW สำหรับการคาพาซิเตท และปรับความเข้มข้นของอสุจิ (ปริมาตร 100 มล.)

นำสารละลายตั้งต้น BWW stockI มา 80 มล. เติมสารละลาย BWW stockII ลงไป 20 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลาย BWW ปริมาตร 100 มล. หลังจากนั้นเติมสารเคมี (จากตาราง 3.3) คือ โซเดียม ไพรูเวท 0.0028 กรัม เพนิซิลินจี 0.006 กรัม สเตรปโตมัยซินซัลเฟต 0.005 กรัม แอมโฟเตอริซิน บี 25 ไมโครกรัม และคาเฟอีน 0.1942 กรัม (10 mM) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1N HCl และ 1N NaOH แล้วนำมาผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ (millipore filter) ขนาด 0.22 ไมครอน (um) เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ แบ่งใส่ขวด ขวดละ 20 มล. ปิดผาให้แน่นพร้อมทั้งปิดทับด้วยกระดาษพาราฟิล์ม เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 1 สัปดาห์ เวลานำมาใช้จะนำมาเติม bovine serum allbumin (BSA) 0.6 มิลลิกรัมต่อ มล. และไฮโปทอรีน (hypotaurine) 0.5 mM

ตารางที่ 3.4 แสดงส่วนประกอบของ supplement สำหรับเตรียมไข่ และการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ส่วนประกอบ	กรัมต่อสารละลาย BWW 100 มล.
glucose	0.100
sodium pyruvate	0.0028
penicillin G	0.006
streptomycin sulfate	0.005
amphotericin B	25 ไมโครกรัม

วิธีเตรียมสารละลาย BWW สำหรับเตรียมไข่แฮมสเตอร์ และการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (ปริมาตร 100 มล.)

นำสารละลาย BWW stockI มา 80 มล. เติมสารละลาย BWW stockII ลงไป 20 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารเคมีดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3.4) คือ กลูโคส 0.10 กรัม โซเดียม ไพรูเวท 0.0028 กรัม เพนิซิลลิน จี 0.006 กรัม สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 0.005 กรัม และแอมโฟเทอริซิน บี 25 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลาย BWW หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1N HCl และ 1N NaOH แล้วนำไปกรองด้วย มิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ เสร็จแล้วแบ่งใส่ ขวด ขวดละ 20 มล. ปิดฝาจุกให้แน่น และปิดทับด้วยกระดาษราพาฟิล์มอีกครั้งนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 1 สัปดาห์ เวลานำมาใช้จะเติม bovine serum albumin (BSA) 0.3 มิลลิกรัมต่อ มล.

3.3. การเตรียมสารละลายเปอร์คอล

เตรียมน้ำยา BWW ให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของความเข้มข้นปกติ นำมา 1 ส่วน ผสมกับสารละลายเปอร์คอล 9 ส่วน จะทำให้ได้สารละลายเปอร์คอลความเข้มข้น 90 % ซึ่งจะใช้เป็นสารละลายตั้งต้นเพื่อจะเตรียมเปอร์คอล 45% และ 30% ต่อไป โดยนำไปผสมกับ BWW ความเข้มข้น 1 เท่า (ความเข้มข้นปกติ) ซึ่งเมื่อผสมกันแล้วจะมีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ เหมือนกับ BWW ที่ใช้ในการคาพาซิเตทอสุจิ ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวต่อไป

สารละลายตั้งต้นที่ต้องใช้ในการเตรียมสารละลายเปอร์คอล 90% 45% และ 30%

1. BWW stockI ความเข้มข้น 10 เท่า (ตารางที่ 3.5)
2. BWW stockII ความเข้มข้น 10 เท่า
3. supplement ความเข้มข้น 100 เท่า (ตารางที่ 3.6)
4. hypotaurine (1 mM) ความเข้มข้น 100 เท่า
5. BWW ความเข้มข้น 1 เท่า ที่ไม่มี supplement (BWW stockI 80 มล. + BWW stock II 20 มล.)

ตารางที่ 3.5 แสดงส่วนประกอบของน้ำยา BWW stockI
ความเข้มข้น 10 เท่า

ส่วนประกอบ	กรัมต่อ 25 มล.
NaCl	1.86056
KCl	1.11125
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.09282
KH_2PO_4	0.05063
Na lactate	1.156 มล.
saturated phenol red	1.563 มล.
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0591 กรัม

วิธีเตรียม BWW stockI ความเข้มข้น 10 เท่า

นำสารเคมี ดังแสดงในตารางที่ 3.5 มาละลายในน้ำมิลลิคิว ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ แยกละลายในอิคเกอร์ต่างหาก) แล้วนำไปกรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ เสร็จแล้วแบ่งใส่ขวด ขวดละ 4 มล. ปิดฝาจุกให้แน่น แล้วปิดทับด้วยกระดาษพาราฟิล์มอีกครั้ง นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน (ปริมาตรที่ใช้ ครั้งละ 2 มล.)

วิธีเตรียม BWW stockII ความเข้มข้น10 เท่า

ชั่ง $NaHCO_3$ 2.106 กรัม ละลายในน้ำมิลลิคิว 20 มล. ซึ่ง $NaHCO_3$ จะละลายไม่หมด จึงต้องนำไปละลายในอ่างน้ำอุ่นที่มี อุณหภูมิ 75 - 80 องศาเซลเซียส เมื่อละลายหมดแล้ว จะนำมากรองผ่าน มิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ

i17305263

ข้อควรระวัง เนื่องจากเบอร์คอล เป็นสารที่ทำให้ปลอดเชื้อไม่ได้ สารละลายทุกชนิดที่จะนำมาผสมกับสารละลายเบอร์คอล จะต้องผ่านการทำให้ปลอดเชื้อมาก่อน

วิธีเตรียม supplement ความเข้มข้น 100 เท่า

ตารางที่ 3.6 แสดงส่วนประกอบของ supplement ความเข้มข้น 100 เท่า

ส่วนประกอบ	กรัมต่อ 3 มล.
Na pyruvate	0.0084
penicillin G	0.018
streptomycin sulfate	0.015
amphotericin B	75 ไมโครกรัม

ละลายสารเคมี ในตารางที่ 3.6 ลงในน้ำมิลลิคิว 3 มล. ผสมให้เข้ากัน เสร็จแล้วนำไปกรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ แล้วแบ่งใส่หลอดพลาสติด หลอดละ 500 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติคมีฝาปิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้นาน 1 เดือน เวลานำมาใช้ นำออกจากตู้เย็นให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นบน vertex mixture เพื่อให้สารเคมีที่อาจติดอยู่ที่หลอดพลาสติคหลุดออก แล้วไปเปตไปใช้ตามปริมาตรที่ต้องการ

การเตรียมไฮโปทอรีน ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 100 เท่า

ละลายไฮโปทอรีน 0.04364 กรัม ในน้ำยา BWW ที่ใช้สำหรับการคาพาซิเตทอสุจิ (ไม่มีกลูโคส) ปริมาตร 2 มล. เสร็จแล้วกรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปแบ่งใส่หลอดพลาสติคที่มีฝาปิด แล้วใส่กล่องพลาสติค ปิดฝา

ให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน เวลานำมาใช้นำออกมาให้ละลายในอุณหภูมิห้องและปั่นแรง ๆ บน vertex mixture เพื่อป้องกันการเกาะติดของสารที่ผิวพลาสติค ไปเปตไปใช้ตามปริมาตรที่ต้องการ

การเตรียม เปอร์คอล 90%

ไปเปตสารละลายเปอร์คอลมา 22.5 มล. ใส่ในบิกเกอร์ขนาด 50 มล. เติม BWW stockI ความเข้มข้น 10 เท่า 2 มล. ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ด้วยไมโครไปเปต จากนั้นเติม BWW stockII ความเข้มข้น 10 เท่า 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันเบา ๆ จะได้สารละลายเปอร์คอล ความเข้มข้น 90% เพื่อใช้เป็นสารละลายตั้งต้นในการเตรียมเปอร์คอล 45% และ 30% ต่อไป

การเตรียมเปอร์คอล 45% และ 30%

สารละลายตั้งต้นที่ใช้

1. BWW (BWW stockI 80 มล. + BWW stockII 20 มล.) ซึ่งนำไปผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน แล้วแบ่งใส่ขวด ขวดละ 10 มล. เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 1 เดือน
2. เปอร์คอล 90%
3. ไฮโปทอรีน ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 100 เท่า
4. supplement ความเข้มข้น 100 เท่า
5. bovine serum albumin

วิธีเตรียม เปอร์คอล 45%

1. ไปเปตสารละลายเปอร์คอล 90% ใส่ขวดขนาด 20 มล. 5 มล.
2. นำสารละลาย BWW (ความเข้มข้น 1 เท่า ที่ไม่มี supplement) ปริมาตร 10 มล. เติม BSA 120 มิลลิกรัม โดยให้ BSA ค่อย ๆ ละลายเองห้ามเขย่าขวด เติมไฮโปทอรีน (1mM) ความเข้มข้น 100 เท่า 100 ไมโครลิตร และเติมsupplementความเข้มข้น100เท่า200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน
3. ไปเปตสารละลายที่ได้จากข้อ 2 ไปใส่ในสารละลายในข้อ 1 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครไปเปต จะได้สารละลายเปอร์คอล 45% ซึ่งจะมี 0.6% BSA และไฮโปทอรีน 0.5 mM อยู่ด้วย

ก่อนใช้จะนำไปใส่ในตู้บ่มที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ความชื้น 95% ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยคลายเกลียวฝาจุกให้หลวม เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

วิธีเตรียมะเปอร์คอล 30%

1. ไปเปตสารละลายเปอร์คอล 90% ใส่ขวดขนาด 20 มล. 3 มล.
2. นำสารละลาย BWW ปริมาตร 10 มล. เติม BSA 90 มิลลิกรัม ไฮโปทอรีน (1mM) ความเข้มข้น 100 เท่า 75 ไมโครลิตร และ supplement ความเข้มข้น 100 เท่า 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน
3. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2 5 มล. ใส่ลงในสารละลายในข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายเปอร์คอล 30% ซึ่งจะมี 0.6% BSA และไฮโปทอรีน 0.5 mM อยู่ด้วย

การเตรียม percoll discontinuous gradient

นำสารละลายเปอร์คอล 45% มา 2 มล. ใส่ที่ก้นหลอดเซนตริฟิว เอียงหลอดประมาณ 30 องศาเซลเซียสแล้วค่อย ๆ ใส่สารละลายเปอร์คอล 30% ลงไปทีละน้อย ๆ อย่างช้า ๆ โดยใช้ไมโครไปเปตครั้งละ 1 มล. จนครบ 2 มล. ต้องทำอย่างเบา ๆ เพื่อไม่ให้สารละลายเปอร์คอลผสมกัน เมื่อใส่ลงไปครบ 2 มล. แล้วจะสังเกตเห็นรอยต่อของสารละลายเปอร์คอล 45% และ 30% แยกเป็นชั้น

3.4. การเตรียมสารละลาย เฮปาริน สำหรับการคาพาซิเตทอสุจิ

ละลายเฮปาริน 10 มิลลิกรัม ในน้ำยา BWW (ไม่มีกลูโคส) 2 มล. จะได้เฮปารินความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ต่อ 100 ไมโครลิตร นำไปกรองด้วยมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่ขวดแก้วเล็ก ๆ 100 ไมโครลิตร ต่อขวด ปิดฝาให้แน่นแล้วปิดทับด้วยกระดาษพาราฟิล์ม นำใส่กล่องพลาสติคมีฝาปิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้ประมาณ 1 เดือน ไม่ควรเก็บไว้นานเพราะเฮปารินอาจเสื่อมสภาพ เวลาใช้นำมาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นบน vertex mixture แล้วนำมาปรับความเข้มข้นตามปริมาณที่ต้องการในการทดลองแต่ละครั้ง ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 3.7 แสดงการเตรียมเฮปาริน ความเข้มข้นต่าง ๆ

เฮปาริน stock solution (ไมโครลิตร)	BWW (มล.)	ความเข้มข้นของเฮปารินที่ได้ (ไมโครกรัม/มล.)
5	2.495	10
10	2.490	20
12.5	2.4875	25
25	2.475	50
50	2.450	100
100	2.400	200

นำสารละลายเฮปาริน stock solution ซึ่งมีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร ไปเปตใส่ในสารละลาย BWW ตามปริมาตรที่แสดงในตารางที่ 3.7 ผสมให้เข้ากัน ก่อนใช้จะนำไปบ่มที่ตู้บ่ม 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 95% ความชื้น และอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยคลายฝาจุกให้หลวมเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

3.5 การเตรียมสารเคมีสำหรับเตรียมไข่แฮมสเตอร์

การเตรียม PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin)

PMSG มีชื่อการค้าว่า Folligon บรรจุในขวดขนาดขวดละ 1,000 หรือ 5,000 หน่วยสากล เวลาเตรียมจะนำมาละลายในน้ำกลั่น (water injection) โดยใช้น้ำกลั่น 10 มล.ต่อ PMSG 1,000 หน่วยสากล จะได้ PMSG ความเข้มข้น 100 หน่วยสากลต่อ 1 มล.

การเก็บรักษา นำไปใส่หลอดพลาสติคที่มีฝาปิด หลอดละ 970 ไมโครลิตร นำใส่กล่องพลาสติคปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซนเซียส ประมาณ 1 เดือน เวลานำมาใช้ นำออกมาให้ละลายที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นบน vertex mixture ก่อนนำไปใช้ เวลาใช้จะใช้ insulin syrings ฉีดเข้าแฮมสเตอร์ ตัวละ 300 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีปริมาณของ PMSG 30 หน่วยสากล

การเตรียม HCG (human chorionic gonadotropin)

HCG มีชื่อการค้าว่า Chorulon บรรจุในขนาดขวดละ 1,000 หรือ 5,000 หน่วยสากล การเตรียมและการเก็บรักษาทำเช่นเดียวกับ PMSG

การเตรียม Hyaluronidase 0.15%

นำ hyaluronidase 7.5 มิลลิกรัม ละลายใน BWW สำหรับเตรียมไข่ 5 มิลลิลิตร เติม BSA ลงไป 15 มิลลิกรัม ปล่อยให้ BSA ค่อย ๆ ละลายแล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ 0.22 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ

การเก็บรักษา ใส่หลอดพลาสติคมีฝาปิด หลอดละ 1 มล. นำไปใส่ภาชนะพลาสติคที่มีฝาปิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

การเตรียม Trypsin 0.15%

นำ trypsin 7.5 มิลลิกรัม ละลายใน BWW สำหรับเตรียมไข่ 5 มล. เติม BSA 15 มิลลิกรัม เช่นเดียวกับ hyaluronidase

3.6 การเตรียมน้ำยา Ham's F-10

Ham's F-10 stock solution

วิธีเตรียม

ละลายผง Ham's F-10 ในน้ำมิลลิคิว 200 มล. ในบิกเกอร์ขนาด 250 มล. และในน้ำมิลลิคิว 100 มล. ละลายแคลเซียมแลคเตท 0.30830 กรัม เพนิซิลลินจี .060 กรัม สเตร็ปโตมัยซิน ซัลเฟต 0.050 กรัม แอมโฟเทอริซิน บี 250 ไมโครกรัม ลงในบิกเกอร์ขนาด 150 มล. ค่อย ๆ เติมสารละลายที่ได้ลงในสารละลาย Ham's F-10 คนให้ละลายเข้ากันเบา ๆ นำสารละลายที่ได้ใส่ขวดแก้วก้นแบน (volumetric flask) ขนาด 1,000 มล. เติมน้ำมิลลิคิวให้ครบ 900 มล. นำไปผ่านเครื่องกรองชุดแบบดูด (suction) ด้วยรูขนาด 0.22 ไมครอน แล้วแบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มล. ปิดจุกให้แน่น และปิดทับด้วยกระดาษพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

Ham's F-10 working solution

วิธีเตรียม

นำสารละลาย Ham's F-10 stock solution มาใส่ในขวดแก้วก้นแบนขนาด 100 มล. 90 มล. ละลาย Hepes ในน้ำมิลลิคิว 5 มล. นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในสารละลาย Ham's F-10 และในน้ำมิลลิคิว 5 มล. ละลาย $NaHCO_3$ 0.084 กรัม นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในสารละลาย Ham's F-10 เสร็จแล้วนำสารละลายที่ได้ไปผ่านด้วยคาร์บอนไดอ็อกไซด์ 5% นาน 5-10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที จึงนำไปปรับ pH ด้วย 1N HCl และ 1N NaOH ให้ได้ 7.4 แล้วนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ขนาด 0.22 ไมครอน แล้วแบ่งใส่ขวดขนาด 30 มล. ขวดละ 18 มล. ปิดจุกให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน ก่อนนำมาใช้จะเติม 10% fetal calf serum

3.7 การเตรียม podophyllotoxin และ vinblastine

ละลาย podophyllotoxin และ vinblastine อย่างละ 1 มิลลิกรัม ในน้ำมิลลิคิว 10 มล. จะได้ความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดอย่างละ 100 ไมโครกรัม ต่อ มล. นำไปกรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ รูขนาด 0.22 ไมครอน แล้วใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 เดือน เวลาใช้ไปเปตมา 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ที่ใช้เลี้ยงไข่ 8.3 มล. จะได้ความเข้มข้นของสารทั้งสอง อย่างละ 0.06 ไมโครกรัม/มล.

ข้อควรระวัง สารทั้งสองชนิดมีอันตรายต่อร่างกายอย่างมาก เวลาเตรียมควรใส่ถุงมือ และมีผ้าปิดจมูก

3.8 การเตรียม hypotonic solution

ละลาย tri sodium citrate 1 กรัม ลงในน้ำกลั่น 100 มล. จะได้ hypotonic solution ความเข้มข้น 1%

3.9 การเตรียม fixative

เติม 1 ส่วนของ glacial acetic acid ผสมกับ absolute ethanol 3 ส่วน ผสมให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดแช่เย็นไว้ (เตรียมสดทุกครั้งที่ใช้และใช้ภายใน 1 วัน)

3.10 การเตรียม 20% Giemsa (ปริมาตรที่เตรียม 1,000 มล.)

สารเคมีที่ใช้เตรียม

1. Giemsa powder
2. glycerol
3. absolute ethanol

วิธีเตรียม

บด Giemsa powder ด้วยครกบดสี โดยเติม glycerol ในปริมาณเล็กน้อยก่อน แล้วค่อย ๆ เติม Giemsa และเติม glycerol ต่อไป โดยใช้ Giemsa 7.5 กรัม และ glycerol 250 มล. บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นเติม absolute ethanol 750 มล. ล้างสีออกจากครกให้หมด เก็บใส่ขวด แล้วนำไปบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปิดจุกทิ้งไว้นาน 2-3 วัน จึงนำไปใช้ได้ เวลาใช้นำไปละลายใน phosphate buffer โดยใช้ความเข้มข้นของสี Giemsa 20%

3.11 การเตรียม phosphate buffer (pH 6.8)

น้ำยาและสารเคมีที่ใช้เตรียม

1. KH_2PO_4
2. Na_2HPO_4
3. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

สารละลาย A

ชั่ง KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล.

สารละลาย B

ชั่ง Na_2HPO_4 9.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล.

working solution

นำสารละลาย A 50.8 มล. ผสมกับสารละลาย B 49.2 มล. เขย่าให้เข้ากัน จะได้ phosphate buffer ที่มี pH ประมาณ 6.8