บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง

สัตว์ทดลอง

หนูแรทพันธุ์วิสตาร์เพศผู้อายุ 24 วัน น้ำหนัก 80-100 กรัม และอายุ 50 วัน น้ำหนัก 225-250 กรัม ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงในเรือนหนู ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยปรับอุณหภูมิ 25 °C ควบคุมแสงสว่าง วันละ 14 ชั่วโมง (06.00 - 20.00 น.)ให้น้ำและอาหารสำเร็จรูปตลอดเวลา

สารเคมีที่ใช้ (สารเคมีที่ใช้เป็น AR grade ทั้งหมด)

Bovine serum albumin (BSA)	: Sigma Chemical , U.S.A.
Charcoal reagent	: WHO RIA reagent programme Switzerland
Dextran reagent	: WHO RIA reagent programme Switzerland
Dibutyral Cyclic adenoside monophosphate	: Sigma chemical,U.S.A.
Diethyl ether	: E.Merk, Germany
Dioxane	: E. Merk, Germany
Disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	: E.Merk, Germany
Ethanol absolute	: E. Merk, Germany
Gelatin	: Difco Laboratories, U.S.A.

HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine N-2-ethanesulfonic acid	:	Gibco Laboratories, U.S.A.
Medium M199	:	Gibco Laboratories, U.S.A
Methyl Parathion	:	Sigma chemical Company, U.S.A.
Mevinphos	:	Sigma chemical Company, U.S.A.
Olive oil	:	Sigma chemical Company, U.S.A.
Popop (1,4-bis(5-pheny) -2-oxazolyl) benzene;2,2-p-Phenylene-bis(5-phenyloxazole)	:	Sigma chemical Company, U.S.A.
PPO (2,5-diphenyloxazole)	:	Sigma chemical Company, U.S.A.
Sodium bicarbonate	:	E.Merk, Germany
Sodium chloride	:	E.Merk, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	:	E.Merk, Germany
Streptomycin	:	Sigma chemical company, U.S.A.
Thiomersal	:	Sigma chemical, Company, U.S.A
Toluene	:	E.Merk, Germany
Trypsin	:	Sigma Chemical Company, U.S.A.

ฮอร์โมนและแอนติบอดี

Human Chorionic gonadotropin : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Testosterone antisera:ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Testosterone standard : WHO RIA reagent programme, Switzerland

(1,2,6,7,^{3}H) testosterone : WHO RIA reagent programme, Switzerland

อุปกรณ์

Beta liquid scintillation Counter (model 1218-811) : Wallac, Finland

Dri-block heater (model DB-3) : Tecam Laboratory and Industrial Equipmen, U.S.A.

Drying cabinet series 2000 : Termark, U.S.A.

Dubnoff incubator skaker (model 3575-1): Labline instrument Inc. U.S.A.

Magnetic Stirror (model S-18520): Thermoline Corporation, U.S.A.

Micropipette (Pipette man m.81) : Gilson, France

(Pipette gun) : Clay-Adams, U.S.A.

PH meter (model 5985) : Cole-Parmer instrument equipment, U.S.A.

Refrigerated centrifuge (model PR-J) : International equipment Company, U.S.A.

Vortex mixer (model M-16715) : Thermoline Corperation, U.S.A.

เครื่องแก้ว

หลอดทดลอง ใช้เลี่ยงเซลล์ และหลอดทดลอง assay RIA : ขนาด 13x10 m/m Labware, Japan

การทดลอง

สารละลายและวิธีเตรียม

1. การเตรียม assay buffer จำนวน 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

sodium dihydrogen phosphate	3.25	กรัม
disodium hydrogen phosphate	11.6	กรัม
sodium chloride	8.8	กรัม
thiomersal	0.1	กรัม
gelatin	1.0	กรัม

ละลาย gelatin ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย และ อุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 35 °c จนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมสารเคมี ที่ละอย่างแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2-7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C มีอายุใช้งาน 1 เดือน

2. Charcoal suspension สารเคมีที่ใช้ประกอบด้วย

buffer solution	100	มิลลิลิตร
charcoal reagent	0.625	กรัม
dextran reagent	0.0625	กรัม

ละลาย dextran ใน buffer solution(จากข้อ 1) หลังจากนั้นเติม charcoal ลงไปเขย่าอย่างแรงประมาณ 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C มี อายุใช้งาน 1 เดือน

3. Scintillation fluid สารเคมีที่ใช้ประกอบด้วย

toluene	1000	มิลลิลิตร
PPO	5.5	กรัม

popop	0.35	กรัม
dioxane	200	มิลลิลิตร

เตรียมโดยผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลและเตรียมก่อนใช้ 1 สัปดาห์

4. การเตรียม Standard testosterone

เตรียมโดยใช้สารมาตรฐานเทสโทสเตอโรนจาก WHO ที่มีความเข้มข้น 220 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปตสารมาตรฐานมา 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลาย assasy buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วนำไป heat ที่ 40 °C นาน 30 นาที จะได้ความเข้มข้น 2.2 พิโคโมลต่อลิตร (stock solution) นำ stock solution มา 2 มิลลิลิตร นำมาทำ serial dilution ดังนี้

ตารางที่ 1. แสดงการเตรียมสารมาตรฐานเทสโทสเตอโรน

ลำดับที่	ความเข้มข้น	ปริมาตร	assay buffer มิลลิลิตร	ความเข้มข้นที่ได้ (fmol/0.5 มิลลิเมตร
1	stock sol^n	2	-	1100
2	1	2	2	550
3	2	2	2	275
4	3	2	2	138
5	4	2	2	69
6	5	2	2	34
7	6	2	2	17

5. การเตรียม testosterone working tracer

จาก (1,2,6,7,^{3}H) testosterone ซึ่งละลายอยู่ใน benzene:ethanol ในอัตราส่วน 9:1 เป็น testosterone stock tracer ที่มีความแรง 5 ไมโครคูรี่/มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ 100 นาโนคูรี่/มิลลิลิตร ด้วยการนำ testosterone stock tracer จำนวน 0.2 มิลลิลิตร. เป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วจึงเติม assay buffer 10 มล. ผสมให้เข้ากันจะได้ testosterone working tracer ที่มีความแรง 100 นาโนคูรี่/มล. เก็บไว้ที่ 4 °C เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

6. การเตรียม testosterone antisera

testosterone antisera จาก หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา ซึ่งอยู่ในสภาพที่ทำให้แห้ง (lyophilized) นำมาเติม assy buffer เขย่าให้ละลายจนหมด เก็บไว้ที่ 4 °C เตรียมแล้วใช้ได้ทันทีโดยเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ หลังจากที่เติมลงในหลอดทดลองแล้ว จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:350000

7. การเตรียม media เลี้ยง Leydig cell เตรียม 2 ชุด คือมี BSA และไม่มี BSA โดยทั้ง 2 ชุด มีสูตรการเตรียมเหมือนกัน

medium M199	0.992 กรัม
HEPES	0.562 กรัม
sodium bicarbonate	0.035 กรัม
streptomycin	0.02 กรัม
BSA	0.20 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิเมตรปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 นำไปกรองผ่าน millipore ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่ 4 °C

8. การเตรียมสารละลายเมวินฟอส (Haider and Upahyaya.,1986)

การทดลองใน in vivo ละลายใน olive oil ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 25 ไมโครกรัม และ 100 ไมโครกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร

การทดลองใน in vitro ละลายใน ethanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.001,0.01, 0.1, 1 และ 10 ppm ต่อ 10 ไมโครลิตร

9. การเตรียมสารละลายเมทิลพาราไธออน

การทดลองใน in vivo ละลายใน olive oil ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม และ 500 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร

การทดลองใน in vitro ละลายใน ethanol ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.001, 0.01,0.1, 1 และ 10 ppm ต่อ 10 ไมโครลิตร

แผนการทดลอง แบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

1. การทดลองใน in vivo แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 กลุ่มยังไม่โตเต็มวัย (immature) ใช้หนูแรทเพศผู้อายุ 24 วัน แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 15 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ฉีด olive oil ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางชั้นใต้ผิวหนัง ในช่วงเวลา 08.00 - 11.00 น.

กลุ่มที่ 2 ฉีดเมวินฟอสขนาด 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าทางชั้นใต้ผิวหนัง ในช่วงเวลา 08.00-11.00 น.

กลุ่มที่ 3 ฉีดเมวินฟอสขนาด 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าทางชั้นใต้ผิวหนัง ในช่วงเวลา 08.00-11000 น.

กลุ่มที่ 4 ฉีดเมทิลพาราไธออนขนาด 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางชั้นใต้ผิวหนัง ในช่วงเวลา 08.00-11.00 น.

กลุ่มที่ 5 ฉีดเมทิลพาราไธออน ขนาด 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

เข้าทางชั้นใต้ผิวหนังในช่วงเวลา 08.00-11.00 น.

1.2 กลุ่มโตเต็มวัย (mature) ใช้หนูแรกเพศผู้อายุ 50 วัน แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 15 ตัว และทดลองเช่นเดียวกัน กลุ่มยังไม่โตเต็มวัย

หนูทุกกลุ่มจะฉีดเมวินฟอสหรือเมทิลพาราไธออนทุกวันจนครบ 30 วัน และในวันที่ 10,20 และ 30 จะเจาะเลือดในช่วงเวลา 13.00 - 16.00 น.ในวันที่ 30 หลังจากเจาะเลือดแล้วจะทำการ autopsy หนูเพื่อนำตัวอย่าง testis ไปเตรียมศึกษาเนื้อเยื่อต่อไป เลือดที่เจาะได้นำไปปั่นเก็บซีรัมไว้ที่ อุณหภูมิ - 20 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

2. การทดลองใน in vitro แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

2.1 กลุ่มที่ยังไม่โตเต็มวัยใช้หนูแรกเพศผู้อายุ 24 วัน จำนวน 10 ตัว นำมาแยก Leydig cell ออกแล้ว แบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เลี้ยง Leydig cells กับเมวินฟอสที่ความเข้มข้น 0, 0.001, 0.01,0.1,1 และ 10 ppm

กลุ่มที่ 2 เลี้ยง Leydig cells กับเมวินฟอสที่ความเข้มข้น 0, 0.001, 0.01,0.1,1,10 ppm และ hCG 0.078 IU

กลุ่มที่ 3 เลี้ยง Leydig cells กับเมวินฟอสที่ความเข้มข้น 0, 0.001, 0.01,0.1,1,10 ppm และ cAMP 10 μm

กลุ่มที่ 4 เลี้ยง Leydig cells กับเมทิลพาราไธออนที่ความเข้มข้น 0, 0.001,0.01,0.1,1 และ 10 ppm

กลุ่มที่ 5 เลี้ยง Leydig cells กับเมทิลพาราไธออนที่ความเข้มข้น 0, 0.001,0.01,0.1,1,10 ppm และ hCG 0.078 IU

กลุ่มที่ 6 เลี้ยง Leydig cells กับเมทิลพาราไธออนที่ความเข้มข้น 0, 0.001,0.01,0.1,1,10 ppm และ cAMP 10 μM

2.2 กลุ่มที่โตเต็มวัยใช้หนูแรทเพศผู้อายุ 70-75 วัน จำนวน 5 ตัว นำมาแยก Leydig cell แล้ว แบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม เช่นเดียวกับกลุ่มที่ยังไม่โตเต็มวัย

เลี้ยง Leydig cell ทุกกลุ่มใน media ที่อุณหภูมิ 34 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใน Dubnoff metabolic shaker incubator หลังจากครบ 2 ชั่วโมงแล้ว นำ media มาวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทันที

<u>การเก็บตัวอย่างเลือด</u>

ใช้วิธีเจาะเลือดจากหัวใจ (Cardiac puncture)โดยสลบหนูด้วย diethyl ether แล้วจับหนูนอนหงายตรวจบริเวณหัวใจเต้นแรงแล้วใช้เข็มเบอร์ 26 ยาว 1/2 นิ้ว แทงลงไปบริเวณนั้น ในหนูอายุ 24 วัน ดูดเลือดออกมาประมาณ 0.5-0.6,0.7-0.8 และ 2 มิลลิลิตร ในวันที่ 10, 20 และ 30 ของการฉีดสารเคมี ส่วนในหนูอายุ 50 วัน ดูดเลือดประมาณ 1,1.1 และ 2 มิลลิลิตร ในวันที่ 10,20 และ 30 ของการฉีดสารเคมี นำเลือดที่ได้ใส่หลอดทดลอง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่ 4 °C แยกส่วนที่เป็นซีรัมไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

<u>การวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA</u>

มีวิธีการดังนี้

1. ปิเปตซีรัม 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate)

2. เติมอีเธอร์หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานหลอดละ 1 นาที

3. ทำการแยกชั้น โดยนำหลอดทดลองที่อยู่ใน test tube rack วางบนถาดน้ำแข็งแห้ง ผสมกับ 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ชั้นล่างของหลอดทดลองจะแข็งตัวชั้นบนจะ

เป็นส่วนของฮอร์โมนที่ถูกสกัดออกมาด้วยอีเธอร์ เทส่วนบนลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง

4. นำหลอดทดลองชุดใหม่ไปทำให้อีเธอร์ระเหยออกไปด้วยการทำให้แห้งโดยนำไปใส่ไว้ใน dry-block heater ที่อุณหภูมิ 40 °C หลอดละประมาณ 1 ชั่วโมง

5. นำหลอดทดลองดังกล่าว มาเติม assay buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer เพื่อให้ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดออกมาละลายอยู่ใน buffer ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง

6. ปิเปต tracer 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด

7. ปิเปต antibody 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

การแยก free form และ bound form ด้วย charcoal suspension

1.ปิเปต charcoal suspension 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในถาดน้ำแข็งแห้งนาน 15 นาที

2. นำไปปั่นแยกเอาส่วน free form ที่จับอยู่กับ charcoal suspension ออกที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที

3. เทส่วนที่เป็น bound form ใส่ใน counting vial เติม scintillation fluid หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่า ให้เข้ากัน แล้วนำไปตราจวัดระดับฮอร์โมนด้วยเครื่อง Beta-liquid scintillation counter นานหลอดละ 5 นาที

ในการทำ RIA ทุกครั้งจะทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยการนำสารมาตรฐานเทสโทสเตอโรนที่เตรียมแบบ serial dilution (ดังตารางที่ 1) ไว้มาใส่หลอดทดลอง (assay tube) แต่ละความเข้มข้นใช้ 500 ไมโครลิตรต่อ 1 หลอด โดยใช้ความเข้มข้นละ 3 หลอด (triplicate) หลังจากนั้นเติม tracer และ antisera จากนั้นก็มีวิธีการเช่นเดียวกันกับหลอดตัวอย่าง

ขั้นตอนการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แสดงด้วยตารางดังนี้

ตารางที่ 2. แสดงขั้นตอนการเติมสารละลายลงในหลอดต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

หลอดทดลอง	Assay buffer ul	Tracer ul	Ab ul		charcoal suspension
TC	600	100	-	ทิ้งไว้ที่	-
NSB	600	100	-	4 องศา	200
TBo	500	100	100	เซลเซียส	200
sample or std	500	100	100	18-24 ชั่วโมง	200

หมายเหตุ

TC = total count

NSB = non specific binding

TB = maximum binding

การหาความสามารถในการสกัดฮอร์โมนตัวอย่าง (% Recovery)

ในการวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทุกครั้งจะหา (% Recovery)ได้โดยวิธีการดังนี้

ปิเปต tracer 50 ไมโครลิตรแล้วเติม pool serum 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง 3 หลอดนำไปเติม อีเธอร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vertex mixer หลังจากนั้นทำการแยกชั้นโดยวางบนถาดน้ำแข็งแห้งเพื่อให้ส่วนของฮอร์โมนถูกสกัดออกมาอยู่ในชั้นของอีเธอร์แล้วนำไป heat จนแห้ง แล้วจึงนำไปปิเปตใส่หลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง 250 ไมโครลิตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ recovery

ปิเปต tracer 50 ไมโครลิตร ใส่ counting vial นำมาเติม buffer 500 ไมโครลิตร จำนวน 3 vial เพื่อหา total count recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ RCE}) \times 2}{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR})} \times 100$$

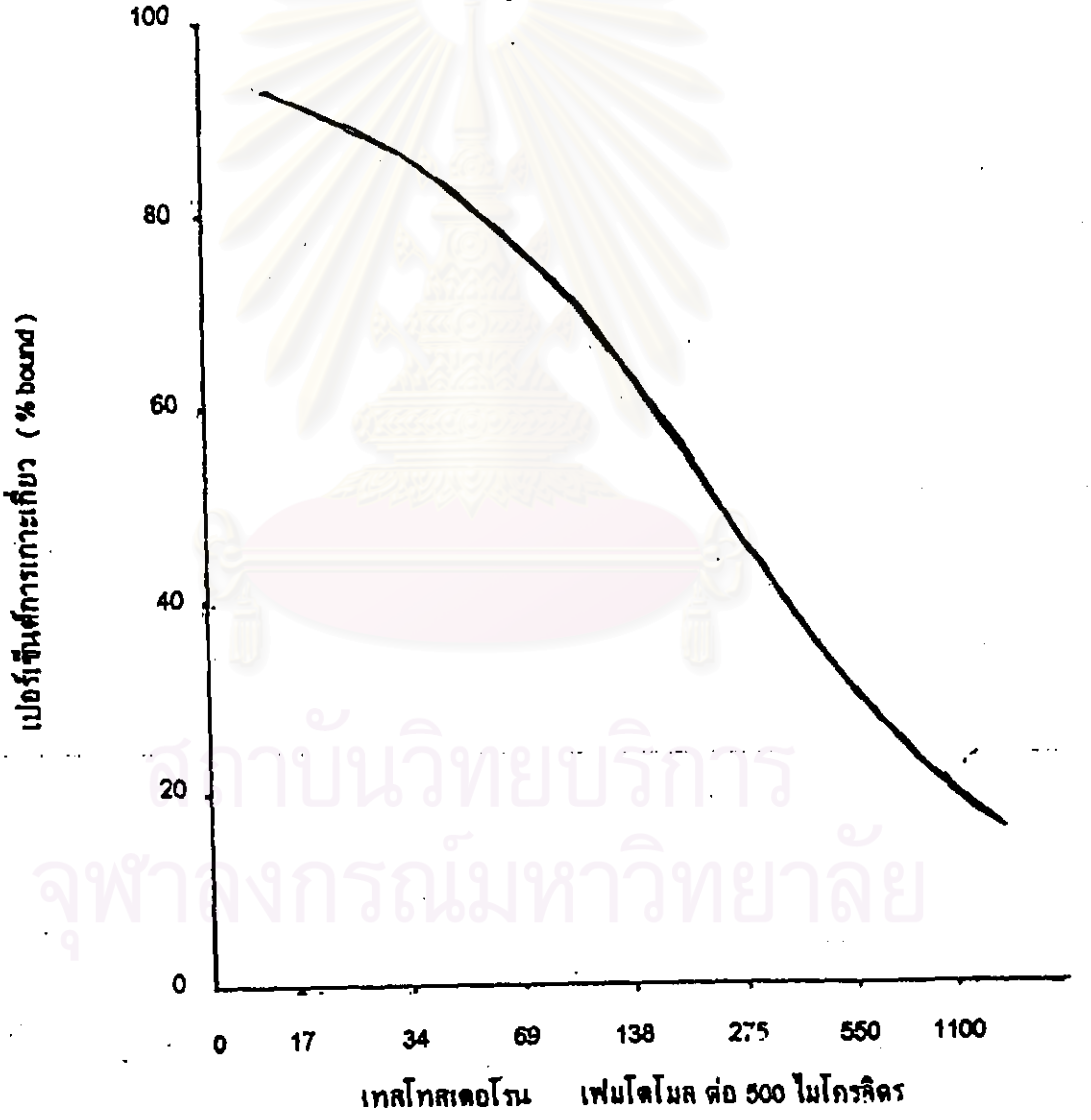
ซึ่งการวิจัยครั้งนี้มีประสิทธิภาพการสกัดเท่ากับ 90-95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐาน

นำค่า cpm ของแต่ละความเข้มข้นมา plot กับความเข้มข้นของ standard บนกระดาษ semi logarithm โดยให้แกน x เป็นเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (% B/B_0) และแกน y คือ log ของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว} = \frac{\text{ค่า cpm เฉลี่ยของสารมาตรฐาน - NSB} \times 100}{\text{ค่า cpm เฉลี่ยของ MB - NSB}}$$



รูปที่ 1. แสดงกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประเมินความเชื่อถือได้ของ RIA

อาศัยตามวิธีการของ Ekins.,1970 และ Abraham.,1974 ซึ่งประกอบด้วย ความจำเพาะ (specificity), ความแม่นยำ (precesion), ความถูกต้อง (accuracy), และความไว (sensitivity) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ความจำเพาะ (specificity)

ความจำเพาะของ RIA หมายถึงความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนหรือ ฮอร์โมนแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดแอนติเจนกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีจะเป็นแบบ polyclonal ดังนั้นมักจะมีปฏิกิริยากับสารอื่นที่มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์เรียกปฏิกิริยาการทดสอบนี้ว่า cross reaction คำนวณได้จาก

เปอร์เซนต์ cross reaction

= ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ 50 % x 100
ปริมาณของสารมาตรฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการ
จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ 50 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอนติบอดีที่ใช้ทดลองครั้งนี้ มีความจำเพาะดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรน และสารอื่นที่นำมาตรวจสอบ

ฮอร์โมน	% cross reaction
testosterone	100
cortisol	0.0001
4-androstenedione	1.62
5αdihydroxy testosterone	77.02

ความแม่นยำ (precesion)

หมายถึง ความสามารถในการวิเคราะห์สารแต่ละครั้งได้ไม่แตกต่างกันซึ่งจะทดสอบความแม่นยำโดยทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสามระดับคือความเข้มข้นระดับต่ำ กลางและสูงชนิดละ 10 ตัวอย่าง แล้วคำนวณหาความแม่นยำของการวิเคราะห์แต่ละระดับความเข้มข้นโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิของความแปรปรวน

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความแม่นยำของการวัด ด้วยการวิเคราะห์ฮอร์โมนที่มีความเข้มข้นระดับปกติ ความเข้มข้นภายใน assay ชุดเดียวกัน (intra-assay) อย่างละ 10 ตัวอย่าง และต่างชุดกันหรือระหว่างชุด(inter-assay) ของการทดลอง 3 ครั้งได้ผลดังนี้

ตารางที่ 4 แสดง % CV ของความแม่นยำใน intra และ inter assay

สารควบคุมคุณภาพ	intra - assay		inter-assay	
	X ± SD	%CV	X ± SD	%CV
ปกติ	230.71± 11.29	4.89	233.52±22.51	9.63

ความถูกต้อง (accuracy)

ความถูกต้อง เป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนแล้วเติมลงในสารตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว ไปผ่านการตรวจวัดพร้อมกับสารตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นที่ได้ กับปริมาณความเข้มข้นจริงที่ทราบ คำนวณค่าความถูกต้องจากสูตรดังนี้

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนที่ใส่ลงไปจริง}} \times 100$$

ตารางที่ 5 แสดงค่าความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณเทสโทสเตอโรน (รัตนา,2538)

สารควบคุมคุณภาพ	ค่าจริง (fmol/tube)	ค่าจากการตรวจวัด (fmol/tube)	% ความถูกต้อง
ระดับสูง	825.00	748.87	90.77
ระดับกลาง	244.44	223.12	91.28
ระดับสูง	78.57	70.19	89.33

ความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity)

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึงค่าที่น้อยที่สุดของฮอร์โมนที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ทำได้โดยการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าเฉลี่ย cpm จากจุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (B_0) ลบด้วย 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดนี้ นำค่า cpm นี้ไปคำนวณหาค่า $B/B_0 x100$ แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐาน ก็จะได้ค่าความไว (Abraham.,1974)

การวิจัยครั้งนี้ได้หาความไว โดยทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย ซึ่งจะได้ความไวของการวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 9 เพมโตโมลต่อมิลลิลิตร

การเตรียม Leydig cell จากหนูที่อัณฑะไม่โตเต็มวัย

อาศัยตามวิธีการของ Dufau et al.,1976

ใช้หนูแรกเพศผู้อายุ 24 วัน จำนวน 2 ตัว เตรียม Leydig cell โดย นำมาเปิดหน้าท้องด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบดึงท่อน้ำอสุจิ นำเอาอัณฑะออกมา จากถุงอัณฑะไปล้างในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร ใน culture dish ขนาด 60x15 มม ที่วางอยู่บนกระบะน้ำแข็งเจาะเยื่อหุ้มอัณฑะด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อและใช้เข็มเขี่ยเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในถุงอัณฑะออกจนหมด ใช้กรรไกรตัดกลุ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้จนละเอียด นำไปใส่ในบีกเกอร์ที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 20 มิลลิลิตร นำไปกวนด้วย magnetic stirror 10 นาที เพื่อให้ seminiferous tubules กระจายออกทั่วกันจากนั้นนำ pasture pipett ดูดกลุ่มเนื้อเยื่อขึ้นลง 50 ครั้งจะช่วยให้เซลล์แตกตัวได้ดีขึ้นแล้วกรองด้วยผ้าก๊อซที่ปลอดเชื้อลงใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วจึงนำไป preincubate ใน Dubnoff metabolic shaker incubator ที่อุณหภูมิ 34 °C เขย่า 60 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนที่เป็น supernatant ทิ้งไป นำกลุ่มเซลล์ที่ได้ไปกระจายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.2 % BSA จำนวน 30 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศ์โดย Hemocytometer และตรวจหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดด้วยการหยด 0.1 เปอร์เซ็นต์ trypan blue 1 หยด และ cell suspension 1 หยด นำไปตรวจนับเซลล์ที่ติดสี และไม่ติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศ์เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงินซึ่งได้เซลล์จำนวน 360,000 cells/ml และมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะนำเซลล์ที่เตรียมได้นี้ไปทดลองในขั้นตอนต่อไปทันที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม Leydig cell จากหนูที่โตเต็มวัย

ดัดแปลงเพิ่มเติมเล็กน้อยจาก Dufau et al.,1976

ใช้หนูแรกเพศผู้อายุ 70-75 วัน จำนวน 1 ตัว เตรียม Leydig cell โดยนำมาเปิดหน้าท้องด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบดึงท่อน้ำอสุจิ นำเอาอัณฑะออกมาจากถุงอัณฑะไปล้างในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร ใน culture dish ขนาด 60x15 มม ที่วางอยู่บนกระบะน้ำแข็งเจาะเยื่อบาง ๆ ที่ถุงหุ้มอัณฑะ ใช้กรรไกรตัดกลุ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้จนละเอียดแล้วนำไปใส่บีคเกอร์ที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 10 มิลลิลิตร ใส่ 2.5% trypsin เพื่อช่วยย่อยสลายกลุ่มเนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปกวนด้วย magnetic stirror 10 นาที ใช้ pasture pipett ดูดขึ้นลง 50 ครั้ง กรองด้วยผ้าก๊อซ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่ 4 °C 15 นาที จากนั้นแยกเอา supernatant ทิ้งไป นำเซลล์มากระจายกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นอีกครั้งด้วย ความเร็ว อุณหภูมิ และเวลาเท่าเดิม หลังจากนั้นแยกเอา supernatant ทิ้งไปนำเซลล์ไปกระจายอีกครั้งกับอาหารเลี้ยง 20 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วจึงนำไป preincubate ใน Dubnoff metabolic shaker incubator ที่อุณหภูมิ 34 °C เขย่า 60 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที ที่ 4 °C 15 นาที แยก supernatant ทิ้งไป นำกลุ่มเซลล์ไปกระจายอีกครั้งในบีคเกอร์ 50 มิลลิลิตร ที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ BSA ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 30 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปนับจำนวนและการมีชีวิตรอดโดยมีวิธีการเช่นเดียวกับหนูที่ยังไม่โตเต็มวัย ซึ่งได้เซลล์จำนวน 394,000 ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเซลล์ที่เตรียมได้นี้จะนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไปทันที

การเลี้ยง Leydig cell ร่วมกับเมวินฟอสและเมทิลพาราไธออน

1. นำเซลล์ที่เตรียมไว้จากขั้นตอนการเตรียม Leydig cell ปิเปตใส่หลอดทดลอง หลอดละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีจำนวน Leydig cell $3.6x10^4$ และ $3.9x10^4$ cell จากหนูที่ยังไม่โตเต็มวัยและโตเต็มวัย ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อยู่บนถาดน้ำแข็งและมีการกวนตลอดเวลา

2. ปิเปตเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี hCG 0.078 IU/100 ไมโครลิตร หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี cAMP 10 μM/100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง

3. ปิเปตเอาเมวินฟอสหรือเมทิลพาราไธออนที่เจือจางอยู่ใน ethanol ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0,0.001,0.01,0.1,1 และ 10 ppm ใน ethanol 10 ไมโครลิตร โดยปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 ไมโครลิตร โดยที่ทุกหลอดมีปริมาตรทั้งหมด 210 ไมโครลิตร

4 นำหลอดทั้งหมดไป incubate ที่อุณหภูมิ 34 °C ใน Dubnoff meta bolic shaker incubator เขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง

5. เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดทดลองมาวางบนถาดน้ำแข็งเพื่อให้เซลล์หยุดการสร้างฮอร์โมน จากนั้นนำมาสกัดฮอร์โมนด้วยการเติม diethyl ether หลอดละ 5 มิลลิลิตร ใช้ฝาปิดหลอดทดลองแล้วคว่ำหงายขึ้นลง 150 ครั้ง

6. นำหลอดทดลองไปปั่นด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 15 นาที เพื่อให้ Leydig cell ตกตะกอนส่วนฮอร์โมนจะถูกสกัดอยู่ในชั้นของ diethyl ether

7. แยกชั้นของ diethyl ether ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยการนำไปแช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่แช่อยู่ในเอทลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ รินส่วนใส ที่เป็น diethyl ether ลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่งที่เตรียมไว้ นำไป dry ให้แห้งด้วย Dri-block heater ที่อุณหภูมิ 40 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง

8. นำหลอดที่แห้งแล้วมาเติม assay buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร เขย่าหลอดละ 1 นาที เพื่อไปชะล้างฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดให้มาอยู่ใน assay buffer เติม trecer และ antibody จากนั้นก็เข้าสู่ขั้นตอนเทสโทสเตอโรน RIA ต่อไป

<u>การทำ paraffin section ของ testis</u>

เมื่อทำการทดลองครบ 30 วัน นำหนูมา autopsy เปิดถุงอัณฑะตัด testis เป็นชิ้นขนาด 2-3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร กลุ่มละ 2 ตัว จากนั้นก็ทำตามขั้นตอนดังนี้

1. fixation

นำเนื้อเยื่อ testis ที่ตัดเป็นชิ้นแล้วมาแช่ลงใน Bouin's fluid ทันที เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเนื้อเยื่อลงใน 70 % alcohol (เปลี่ยนใหม่ทุกสัปดาห์)

2. Dehydration

ถ่ายเนื้อเยื่อจาก 70 % alcohol ลงใน 90 % ethyl alcohol เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น เปลี่ยนใส่ 95 % ethyl alcohol ข้ามคืนโดยเปลี่ยน 95% ethyl alcohol 2 ครั้ง และถ่ายลงใน n-butly alcohol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. Clearing

ใส่เนื้อเยื่อใน xylene 1 ชั่วโมง

4. Impregnation

ถ่ายเนื้อเยื่อที่อยู่ใน xylene ลงใน xylene + molten wax อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ในตู้อบอุณภูมิ 58 °C แล้วถ่ายลง wax_1 ที่ 58 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายลง wax_2 ที่ 58 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. Embedding

embed เนื้อเยื่อลงใน paraffin ทิ้งไว้ให้เย็น

6. Section

ตัดเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอน embedding มาตัดด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 6 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปติดบนแผ่นสไลด์โดยอาศัย egg albumin เพื่อช่วยให้ section ติดกับแผ่นสไลด์ได้ดีขึ้น

7. Hydration

นำเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์แล้วมาล้าง paraffin ออก โดยใช้ xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นเปลี่ยนลงใน n-butyl alcohol 95 %, 70 % ethyl alcohol, น้ำประปา ขั้นตอนละ 3 นาที

8. Staining

ย้อมด้วย Haematoxylin และ Eosin โดยนำสไลด์จากขั้นตอน hydration มาย้อมด้วยสี Haematoxylin 10-12 นาที แล้วนำไป differentiate ด้วย acid alcohol) 5-10 วินาที จากนั้นล้างในน้ำประปา 5 นาที แล้วเปลี่ยนลงใน 70 %, 90 % ethyl alcohol ขั้นตอนละ 3 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี eosin (ใน 95 % alcohol) 3-5 นาที ล้างสีด้วย 95 % ethyl alcohol 15-30 วินาที แล้วย้ายลงใน n-butyl alcohol, $xylene_1$, $xylene_2$ ขั้นตอนละ 5 นาที นำมา mount ด้วย cannada balsam ทิ้งไว้ให้แห้ง

นำสไลด์ที่ได้มาทำการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงและบันทึกภาพของการเปลี่ยนแปลงของ Leydig cell

<u>การแปลผลทางสถิติ</u>

ปริมาณฮอร์โมนที่วัดได้ในแต่ละกลุ่มนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ T-test two way analysis ที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$ หรือ $P<0.01$