

เครื่องมือ สารเคมี และการเตรียมสาร



2.1 เครื่องมือ

Analytical balance (Mettler, Switzerland)

Balance, one pan, model P 1200 N (Mettler, Switzerland)

Columns Type K 9/30, 0.9 X 30 cm. (Pharmacia Fine Chemicals Inc., Piscataway, New Jersey 08854, USA.)

Deep freezer model 140 (Scientemp, USA)

Eppendorf micropipette size 5, 10, 50, and 100 microliter (Eppendorf, Germany)

IEC HT Centrifuge 10,000 rpm. (Damon/IEC Division, International Equipment Company, USA.)

Incubator 37°C, Magni-whirl constant temperature bath (Blue M Electric Company, Illinois, USA.)

Incubator 25°C, Heto Frig incubator. (Heto Birkerd, Denmark)

Magnetic stirrer. (Baird & Tatlock Ltd., Chadwell Health Essex, England.)

Maxi-mixTM (Thermolyne, Sybron Corporation, USA.)

pH Meter (Corning, USA.)

Programma 101 (Olivetti, USA.)

Rack Gamma Counter (LKB Limited, Finland)

Refrigerated centrifuge, MSE Mistrel 4L. (Measuring & Scientific Equipment Ltd., Manor Royal Crawley Sussex, England)

2.2 สารเคมี

Activated charcoal (ผงถ่าน) Norit, Laboratory reagent, particle size 4-5 microns. (Serva, Heidelberg, Germany)

Anti-Human Prolactin (แอนติบอดีต่อโปรแลคตินของคน) lyophilized, AFP-Anti-hPRL-1 (National Institutes of Health, London, England) ได้รับความช่วยเหลือจากฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bovine Serum Albumin (BSA) (โบวีน ซีรัม แอลบูมิน) Crystallized and lyophilized. (Sigma Chemical Company, USA.)

Chloramine-T (คลอรามิน-ที) (E. Merck AG, Darmstadt, Germany)

Dextran T 70 (เดกซ์แทรน ที 70) (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)

Human Prolactin standard (โปรแลคตินมาตรฐาน) lyophilized, AFP 1582 C (ของ National Institutes of Health, London, England) ได้รับความช่วยเหลือจากฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

^{125}I -Human Prolactin (โปรแลคตินที่ติดสลาควัยไอโอดีน-125) Lyophilized (ของ World Health Organization, Swiss Federal Reactor)

Institute, Wurenlinger, Switzerland) ได้รับความช่วยเหลือจากฝ่ายเวชศาสตร์
ประชากร

Quality Control Programe serum (Q C P serum ของ World Health
Organization) ได้รับความช่วยเหลือจากฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร

Sephadex G-75 (เซฟาเดกซ์ จี-75) fine grade (Pharmacia Fine
Chemicals, Uppsala, Sweden)

Sodium bicarbonate (โซเดียมไบคาร์บอเนต) A.R. : Sodium chloride
(โซเดียมคลอไรด์) A.R. : Sodium dihydrogen phosphate dihydrate (โซเดียม
ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ไดไฮเดรต) A.R. : Ammonium bicarbonate (แอมโมเนียม
ไบคาร์บอเนต) A.R. (May and Baker Ltd., England)

Sodium iodide-125 (โซเดียม ไอโอดีน-125) free from reducing
agent, for protein iodination, in NaOH pH 8-11 (The Radiochemical
Centre, Amersham, England)

Sodium metabisulphite (โซเดียมเมทาบิซัลไฟต์) A.R. : Sodium
phosphate dibasic anhydrous (โซเดียมฟอสเฟต ไดเบสิคแอนไฮไดรด์) granular,
A.R. : ThiomerSAL (ไทโอมอร์ซอล) Laboratory reagent (BDH Chemical Ltd.,
Poole, England)

Standard hormones ได้แก่ Follicle-stimulating hormone (FSH)
Luteinizing hormone (LH) Human chorionic gonadotrophin (hCG) Human
growth hormone (hGH) and Human placental lactogen (hPL) นอกจากนี้ได้
กล่าวไปแล้วยังมีสารเคมีอื่น ๆ อีก ที่ได้รับความช่วยเหลือจากฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 การเตรียมสารละลาย 0.01 โมลาร์ โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) pH8.6 เตรียมโดยชั่ง NaHCO_3 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. แล้วปรับให้ได้ pH8.6

2.3.2 การเตรียมสารละลาย 0.01 โมลาร์ แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (NH_4HCO_3) pH8.2 เตรียมโดย ชั่ง NH_4HCO_3 0.079 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. แล้วปรับให้ได้ pH8.2

2.3.3 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตัมพีเฟออร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 7.4 เตรียมโดย ชั่งสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- ก. 0.305 กรัม โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไคไฮเดรต
- ข. 1.160 กรัม โซเดียมฟอสเฟต ไคเบซิกแอนไฮไดรด์
- ค. 8.800 กรัม โซเดียมคลอไรด์
- ง. 0.100 กรัม ไทโอเมอร์วอล

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 800-850 มล. ปรับให้ได้ pH 7.4 โดยใช้กรดเกลือที่มีความเข้มข้น เมื่อ pH สูงไป และใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น เมื่อ pH ต่ำไป เมื่อได้ pH ตามต้องการแล้ว จึงทำปริมาตรสุดท้ายให้เป็นหนึ่งลิตร ถ่ายสารละลายลงในขวดสีชา แล้วเก็บในตู้เย็น 4°C

2.3.4 การเตรียมแอสเสัมพีเฟออร์ เตรียมโดยการละลายสาร BSA 1 กรัมในสารละลายฟอสเฟตัมพีเฟออร์ 200 มล. แล้วถ่ายใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C เวลาต้องการใช้ให้เทแบ่งออกมาใช้ตามปริมาตรที่ต้องการ

2.3.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ก. เตรียม hPRL มาตรฐานด้วยสารละลาย NH_4HCO_3 โดยให้สารละลายมาตรฐาน hPRL มีความเข้มข้นของ hPRL 1 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร แบ่งสารละลาย

มาตรฐานนี้ เก็บในหลอดเล็ก ๆ หลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำให้แห้งอีกครั้ง แต่ละหลอดจะมีความเข้มข้น hPRL 5 ไมโครกรัม เก็บไว้ที่ -40°C จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดสอบ สลากก็ให้นำมาละลายด้วยฟิโอฟอร์ 10 ไมโครลิตร (ดูวิธีในบทที่ 3)

ข. เตรียม hPRL มาตรฐานด้วยสารละลาย NaHCO_3 โดยให้สารละลายมาตรฐาน hPRL มีความเข้มข้นของ hPRL 1 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร แยกสารละลายมาตรฐานนี้ เก็บในหลอดเล็ก ๆ หลอดละ 10 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40°C จนกว่าจะนำมาใช้เตรียมกราฟมาตรฐานและการทดลองอื่น ๆ

2.3.6 การเตรียมสารละลาย anti-hPRL เตรียมได้โดยการละลายสารนี้ซึ่งเป็น **lyophilized form** ด้วยน้ำกลั่น 1 มล. จะได้สารละลาย anti-hPRL มีความเข้มข้น 1:40 แยกสารละลายเก็บใส่หลอดเล็ก ๆ หลอดละ 10 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

2.3.7 การเตรียม **charcoaled serum** นำซีรัมที่เหลือจากการใช้วิเคราะห์สารอื่นมาแล้ว เก็บรวมกันแล้วเติมผงถ่าน (**activated charcoal**) ซึ่งล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วอบให้แห้ง โดยให้มีอัตราส่วน 1:50 (กรัม : มล) เติมไทโอเมอร์ซอล 0.1 กรัม เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชม. นำมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 10,000 รอบ/นาที หลอด ๆ ครั้งจนกว่าซีรัมปราศจากผงถ่าน แยก **charcoaled serum** ที่ได้เป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งไว้ใช้สำหรับเติมลงในส่วนผสมของการทดลองเตรียมกราฟมาตรฐาน โดยแบ่งเก็บในหลอด ๆ ละ 2.2 มล. อีกส่วนหนึ่งไว้ใช้สำหรับเติมสารมาตรฐาน hPRL เพื่อใช้ในการทดลองควบคุมคุณภาพของการแอสเส (internal quality control)

2.3.8 การเตรียม **pooled serum** สำหรับเป็น **quality control** เตรียมโดยเติมสารละลาย hPRL มาตรฐานลงใน **charcoaled serum** ที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.3.7 ให้มีความเข้มข้นอยู่ 3 ระดับดังนี้

<u>Pooled serum</u>	<u>ปริมาณ hPRL ที่เติม</u>	<u>Charcoaled serum</u>	<u>Concentration</u>
	(ng)	(mI)	(ng/0.1ml)
คาคา (Pคาคา)	300	50	0.6
คากกลาง (Pคากกลาง)	1,000	50	2.0
คาคสูง (Pคาคสูง)	2,500	50	5.0

แบ่งเก็บไว้เป็นหลอด ๆ ละ 1.5 มล. ไว้ที่อุณหภูมิ -40°C จนกว่าจะนำมาใช้

2.3.9 การเตรียม ^{125}I -hPRL (ขององค์การอนามัยโลก) ความเข้มข้น 5,000 cpm/0.1ml เตรียมได้โดยการละลาย ^{125}I -hPRL (lyophilized) คิวแอตเสปฟเฟอร์ 1 ml เก็บที่ 4°C เมื่อต้องการใช้ ให้แบ่งมา 0.1 ml เติมแอตเสปฟเฟอร์ 10.4 ml มื้อเช้าแล้วเหลือให้เทเก็บไว้ในที่สำหรับเก็บสารละลายกับมันศภาพรังสี.