บทที่ 3

วิธีทดลอง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 สารละลายสำหรับเตรียมเฟอริตินจากตับของคน

3.1.1.1 สารละลาย 1M กรดอะซีติค

ผสมกรดอะซีติคเข้มข้น 57.5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.1.2 สารละลาย 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัม และโซเดียมเอไซด์ 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.1.3 สารละลาย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์

ชั่งโซเดียมไดเอทิลบาร์บิทูเรท 10.3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร ปรับpH ให้ได้เท่ากับ 7.5 ด้วย 0.1 M กรดไฮโดรคลอริค แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

ชั่งโซเดียมเอไซด์ 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลาย เวอโรนาลบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.2 สารละลายสำหรับใช้วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry

3.1.2.1 สารละลายฟีนอลรีเอเจนท์

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดท 12.5 กรัม และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ด้วยไฟอ่อน ๆ 2 ชั่วโมง แล้วเติมลิเทียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2 – 3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาป้องกันแสง

ก่อนใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1

3.1.2.2 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

เป็นส่วนผสมของ 1 % คิวปริคซัลเฟต 1 มิลลิลิตร 1 % โปแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรท 1 มิลลิลิตร และ 2 % โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิลิตร

3.1.2.3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง BSA (grade A) 100 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.3 สารละลายที่ใช้ในการทำโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส (David 1964 ; Clarke 1964)

3.1.3.1 สารละลาย TEMED ในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.9

ประกอบด้วย 1 M กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 48 มิลลิลิตร ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล)เมทิลลามีน 36.6 กรัม และ TEMED 0.23 มิลลิลิตร ละลาย

ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.9 ด้วย 1M กรดไฮโดรคลอริค เติมน้ำกลั่นให้มี ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3.2 สารละลายอะไครลาไมด์

ประกอบด้วยอะไครลาไมด์ 20 กรัม BIS 0.735 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3.3 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.14 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

3.1.3.4 สารละลายทริสไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3

ชั่งทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) เมทิลลามีน 6 กรัม และไกลซีน 28.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

ก่อนใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 9

3.1.3.5 สารละลาย 40 % ซูโครส

ชั่งซูโครส 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.3.6 สารละลายสีอะมิโดแบล็ค

ชั่งแนบทาลีนแบล็ค 12 B 1 กรัม ละลายด้วยกรดอะซีติค (7%) ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.3.7 สารละลายบรอมฟีนอลบลู

ชั่งบรอมฟีนอลบลู 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นใหม่ ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.3.8 สารละลายสีปรัสเซียนบลู

ประกอบด้วย 2 % โปแตสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ 1 ส่วน ผสมกับ 1 % กรดไฮโดรคลอริค 2 ส่วน (เตรียมก่อนใช้)

3.1.4 สารละลายที่ใช้ในการทำอิมมิวโนดิฟฟิวส์ชัน

3.1.4.1 สารละลาย 0.075 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.6

ชั่งกรดไดเอทิลบาร์บิทูเรท 0.276 กรัม และโซเดียมไดเอทิลบาร์บิทูเรท 1.545 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นใหม่ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.4.2 1% อะการ์โรสใน 0.075 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH8.6

ต้มอะการ์โรส 1 กรัม ด้วย 0.075 เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.6 (จากข้อ 3.1.4.1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำเดือด จนอะการ์โรสละลายหมด แบ่งเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.4.3 สารละลายสีอะมิโดแบล็ค

ละลายสีแนบทาลีนแบล็ค 12 B 5 กรัม ด้วยกรดอะซีติคเข้มข้น 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.4.4 สารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.5 สารละลายสำหรับเตรียมเฟอริตินอิมมิวโนแอคสอบเบนท์

3.1.5.1 สารละลาย 20 % โซเดียมไฮโดรซัลไฟท์

ชั่งโซเดียมไฮโดรซัลไฟท์ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มี ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.5.2 สารละลาย 30 % กรดอะซีติค

ผสมกรดอะซีติคเข้มข้น 30 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.5.3 สารละลาย 10 % กรดซัลฟูริค

ผสมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.5.4 สารละลาย 2 M กรดไฮโดรคลอริค

ผสมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 171.7 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.5.5 สารละลาย 1 % โซเดียมไนไตรท์

ชั่งโซเดียมไนไตรท์ 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.5.6 สารละลาย 0.2 M บอเรทบัฟเฟอร์ pH 8.4

นำ 0.2M กรดบอริค (12.4 กรัม/ลิตร) 50 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.4 ด้วย 0.05 M บอแรกซ์ (19.05 กรัม/ลิตร)

3.1.5.7 สารละลาย 0.04 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.9 % โซเดียมคลอไรด์

นำ 0.04 M ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (5.677กรัม/ลิตร) 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 ด้วย 0.04 M โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท (6.24 กรัม/ลิตร)

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัม ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.5.8 สารละลาย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เตรียมเวอโรนาลบัฟเฟอร์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1.3 แต่ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0

ชั่งอัลบูมิน (BSA) 0.5 กรัม ละลายด้วย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.6 สารละลายสำหรับติดฉลากแอนติเฟอริตินด้วยโซเดียมไอโอไดด์ 125

3.1.6.1 สารละลาย 0.3 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4ที่มี 0.9% โซเดียมคลอไรด์

นำ 0.3M ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (4.259 กรัม/100 มิลลิลิตร) 90 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 ด้วย 0.3 M โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท (4.68 กรัม/100 มิลลิลิตร)

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.9 กรัม ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่

เตรียมไว้ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.6.2 สารละลายคลอรามีน – ที

ชั่งคลอรามีน – ที 26 มิลลิกรัม ละลายด้วย 0.3 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ (จากข้อ 3.1.6.1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมทันทีก่อนใช้)

3.1.6.3 สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์

ชั่งโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 60 มิลลิกรัม ละลายด้วย 0.3 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.9 % โซเดียมคลอไรด์(จากข้อ 3.1.6.1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.1.6.4 สารละลาย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.1.5.8

3.1.6.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริค pH 3.0 2.5 และ 2.0

นำน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร มาปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริค ให้ได้เท่ากับ 3.0 2.5 และ 2.0 ตามลำดับ

3.1.7 สารละลายสำหรับหาปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคน

3.1.7.1 สารละลาย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน (Cohn fraction V) 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โซเดียมคลอริค 6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.2 % โซเดียมเอไซด์

ชั่งอัลบูมิน (Cohn fraction V) 0.5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 0.6 กรัม ละลายด้วยเวอโรนาลบัฟเฟอร์จากข้อ 3.1.1.3 ให้มี

ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.7.2 สารละลาย 0.05M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 4 กรัม/100 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.02 % โซเดียมเอไซด์

เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.1.7.1 แต่ใช้อัลบูมิน 4 กรัม

3.1.7.3 สารละลาย 0.1 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.04 % โซเดียมเอไซด์

ชั่งอัลบูมิน 0.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 0.6 กรัม และโซเดียมเอไซด์ 0.02 กรัม ละลายด้วย 0.1 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร

3.1.7.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริค pH 3.0 2.5 และ 2.0

เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.1.6.5

3.2 การเตรียมคอลัมน์ของเจลฟิลเตรชันสำหรับใช้ในการเตรียมเฟอริติน

3.2.1 การเตรียมคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ G200

แช่เซฟาเด็กซ์ G 200 10 กรัม ใน 0.05M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์ (จากข้อ 3.1.1.3) 500 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน หรือที่ 90 – 100 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในหลอดแก้วตรง ขนาด 1.7 x 90 เซ็นติเมตร ผ่านสารละลาย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ G 200 อีก 18 ชั่วโมง ที่

อุณหภูมิห้อง (26 – 28 องศาเซลเซียส) ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตร /ชั่วโมง แรงดันสารละลาย 14 เซ็นติเมตรของน้ำ เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารผสมของบลูเด็กซ์แตรน 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยีโมโกลบิน 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และโปแตสเซียมโครเมต 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียมคอลัมน์ของเซฟาโรส 6 B

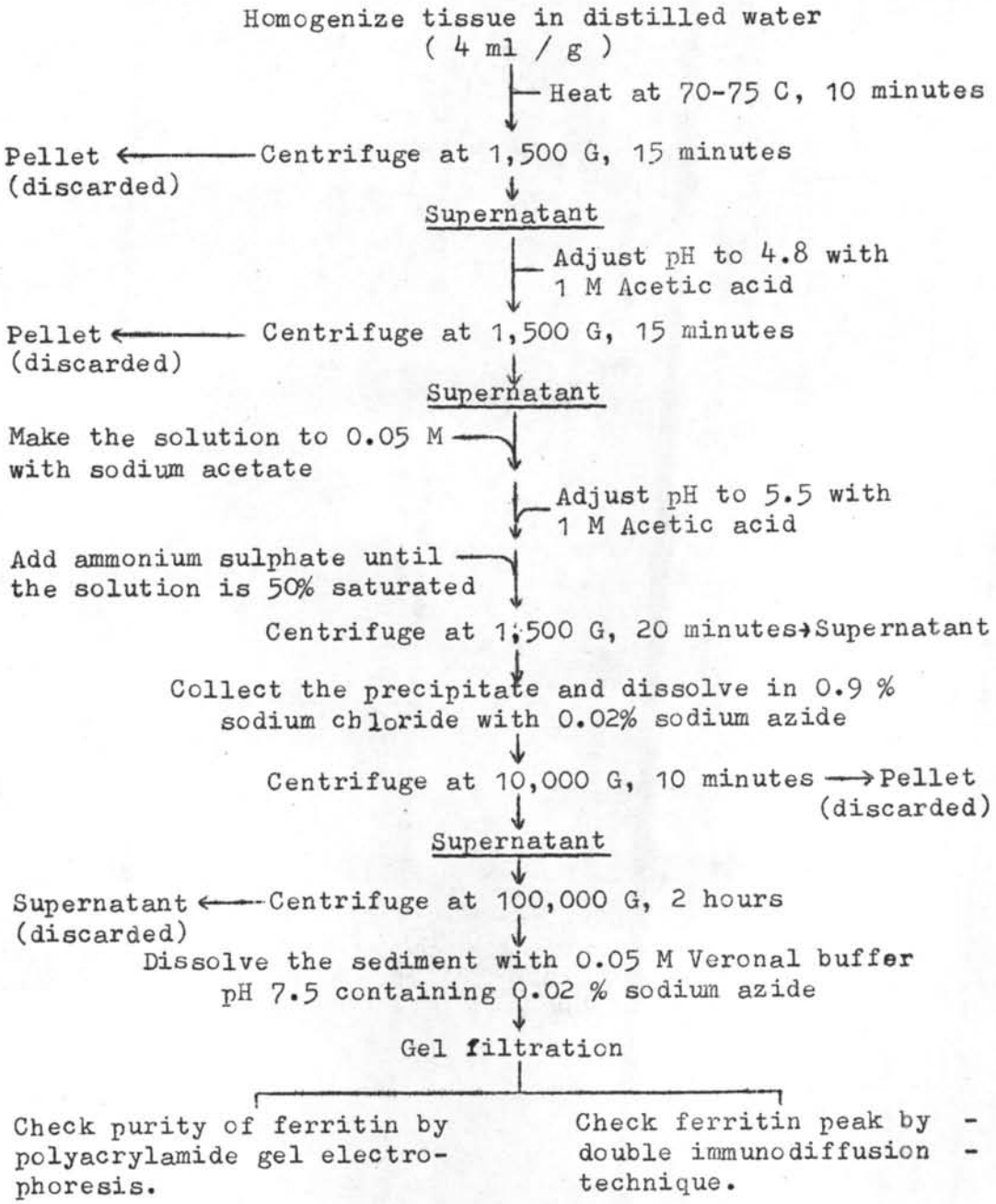
ล้างเซฟาโรส 6 B ประมาณ 300 มิลลิลิตร ด้วย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์ (ข้อ 3.1.1.3) 3 ครั้ง นำมาบรรจุในหลอดแก้วตรงขนาด 1.7 x 100 เซ็นติเมตร ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์จากข้อ 3.1.1.3 ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาโรส 6 B อีก 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26 – 28 องศาเซลเซียส) ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ที่แรงดันสารละลาย 80 เซ็นติเมตรของน้ำ เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

3.3 การเตรียมเฟอริตินจากตับของคน

เตรียมตามวิธีของ Worwood และคณะ (1975) ตามขั้นตอนดังนี้ (ดูรูปที่ 8 ประกอบ)

3.3.1 การเตรียมสารละลายสกัดตับ

ตัดตับประมาณ 100 กรัมออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ บดด้วยเครื่องบดพร้อมเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 4 มิลลิลิตร/ตับ 1 กรัม นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 – 75 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง เพื่อให้เย็นตัวอย่างรวดเร็ว ปั่นแยกตะกอนทิ้งด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 1,500 G 15 นาที แยกสารละลายใสที่ได้มาปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.8 ด้วย 1 M กรดอะซีติค แล้วปั่นแยกตะกอนทิ้ง อีกครั้งหนึ่งด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 1,500 G 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้สำ



รูปที่ 8 ขั้นตอนการเตรียมเฟอริตินจากตับคนตามวิธีของ Worwood และคณะ 1975.

หรับเตรียมขั้นต่อไป

3.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมโซเดียมอะซีเตทลงในสารละลายส่วนใสจากข้อ 3.3.1 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.05M ปรับpH ให้ได้เท่ากับ 5.5 ด้วย 1 M กรดอะซีติค แช่สารละลายนี้ในอ่างน้ำแข็ง เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างช้า ๆ จนสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 50 % (310 กรัม/ลิตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 0 – 2 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 1,500 G 20 นาที ละลายตะกอนโปรตีน ที่ได้ด้วย 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์ (จากข้อ3.1.1.2)

3.3.3 การปั่นแยกเฟอริตินด้วยแรงหนีศูนย์กลาง

นำสารละลายโปรตีนจากข้อ 3.3.2 มาปั่นแยกด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 10,000 G 10 นาที เก็บส่วนใสไปปั่นด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100,000 G 2 ชั่วโมง ละลายส่วนอัดแน่นด้วย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์ (จากข้อ 3.1.1.3)

3.3.4 การเตรียมเฟอริตินให้บริสุทธิ์ด้วยการกรองผ่านเจล

3.3.4.1 การใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G 200

เติมสารละลายจากข้อ 3.3.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ G 200 ชะด้วย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์ (จากข้อ 3.1.1.3) เก็บแยกส่วนสารละลาย ที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ติดต่อกัน 50 หลอด ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (Fraction colector) นำสารละลายในแต่ละหลอดมาวัดการดูดแสงเหนือม่วง ที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร

เก็บสารละลายแต่ละส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.4.2 การใช้คอลัมน์เซฟาโรส 6 B

เติมสารละลายจากข้อ 3.3.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ของเซฟาโรส 6 B ชะด้วย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.02 % โซเดียมเอไซด์ (จากข้อ 3.1.1.3) เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ หลอดละ 4 มิลลิลิตร ติดต่อกัน 70 หลอด ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายแต่ละหลอดมาวัดการดูดแสงเหนือม่วง ที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร

เก็บสารละลายแต่ละส่วน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

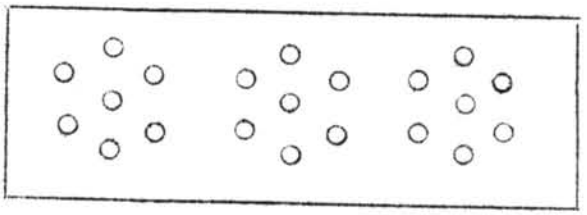
3.4 การตรวจสอบตำแหน่งของเฟอริตินจากสารละลายที่เก็บได้จากคอลัมน์ เซฟาโรส 6 B

วิธีตรวจสอบใช้หลักปฏิกริยาทางอิมมิวโนโลยี ด้วยเทคนิคของอิมมิวโนดิฟฟิวส์ชัน

3.4.1 การทำอิมมิวโนดิฟฟิวส์ชัน

ต้ม 1 % อะการ์โรส จากข้อ 3.1.4.2 ในอ่างน้ำเดือดให้หลอมเหลว แล้วเคลือบบนแผ่นกระจกใสขนาด 2.5 x 7.5 เซ็นติเมตร แผ่นละ 3 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นจนแข็งตัว จึงเจาะหลุมดังรูปที่ 9 เติมแอนติเฟอริตินลงในหลุมกลาง และสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบลงในหลุมรอบ ๆ จนเต็ม ปล่อยให้เกิดปฏิกริยาในกล่องที่อิ่มตัวด้วยความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง 18 – 24ชั่วโมง

การตรวจสอบตำแหน่งของเฟอริตินใช้หลักว่า สารละลายใดที่มีเฟอริตินจะเกิดเส้นของตะกอนโปรตีนขึ้นระหว่างหลุมของสารละลายนั้นกับหลุมของแอนติเฟอริติน



รูปที่ 9 ตำแหน่งการเจาะหลุมบนแผ่นอะการ์โรส สำหรับทำอิมมิวโนดิฟฟิวส์ชัน (ขนาดเท่าของจริง)

3.4.2 วิธีย้อมโปรตีนในแผ่นอิมมิวโนดิฟฟิวส์ชันด้วยสีอะมิโดแบล็ค

แช่แผ่นอิมมิวโนดิฟฟิวส์ชันจากข้อ 3.4.1 ด้วย 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้ง และแช่ตอด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ๆ ละ 18 – 24 ชั่วโมง ปิดผิวหน้าด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 – 6 ชั่วโมง ย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็ค (สารละลายข้อ 3.1.4.3) 15 – 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 2 % กรดอะซีติค

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเฟอริตินด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส

การทำโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส ดัดแปลงเล็กน้อย จากวิธีของ David และ Clarke (David 1964 ; Clarke 1964) ตามขั้นตอนดังนี้

3.5.1 วิธีแยกโปรตีนด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส

ผสมสารละลาย TEMED (จากข้อ 3.1.3.1) 1 ส่วน สารละลายอะไครลาไมด์ (จากข้อ 3.1.3.2) 2 ส่วน น้ำ (pH 9) 1 ส่วน และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (จากข้อ 3.1.3.3) 4 ส่วน เข้าด้วยกัน (ส่วนผสมนี้มีอะไครลาไมด์ 5 %) บรรจุลงในหลอดแก้วให้มีความยาว

10 เซ็นติเมตร นำอะไกรลาไมด์ที่แข็งตัวแล้ว ประกอบเข้ากับภาชนะส่วนบนและล่างที่บรรจุทริสไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3 (จากข้อ 3.1.3.4) ส่วนละ 500 มิลลิลิตร

นำสารผสมระหว่างโปรตีนตัวอย่างกับ 40 % ซูโครส (มีความเข้มโปรตีนประมาณ 100 ไมโครกรัม/0.1 มิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร เติมลงบริเวณผิวหน้าด้านบนของเจล เติมสารละลายบรอมฟีนอลบลู (ข้อ 3.1.3.7) 1 มิลลิลิตร ลงในบัฟเฟอร์ของภาชนะส่วนบน เดินไฟฟ้ากระแสตรงที่มีกระแสคงที่ 3 มิลลิแอมแปร์/เจล โดยให้ขั้วลบอยู่ด้านบนของภาชนะรอจนกระทั่งแถบสี บรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ถึงระยะทางประมาณ 1 เซ็นติเมตร จากปลายล่างของแท่งเจล

3.5.2 <u>วิธีย้อมโปรตีนในโพลีอะไครลาไมด์เจลด้วยสีอะมิโดแบล็ค</u>

นำเจล (จากข้อ 3.5.1) ออกจากหลอดแก้ว ย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็ค (จากข้อ 3.1.3.6) 30 นาที บริเวณที่มีโปรตีนจะติดสี ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 7 % กรดอะซีติค จนกระทั่งบริเวณที่ไม่มีโปรตีนใส

นำไปวัดการดูดแสงของแถบสีที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร

3.5.3 <u>วิธีย้อมเหล็กในโพลีอะไครลาไมด์เจลด้วยสีปรัสเซียนบลู</u>

นำเจลจากข้อ 3.5.1 ออกจากหลอดแก้ว ย้อมด้วยสารละลายปรัสเซียนบลู (จากข้อ 3.1.3.8) 15 – 30 นาที บริเวณที่มีเหล็กจะเกิดสีเขียวปนน้ำเงิน ล้างสารละลายส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น

นำไปวัดการดูดแสงของแถบสีของเหล็ก ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร

3.6 <u>วิธีวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry</u> (Lowry และคณะ 1951)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลน์คอบเปอร์ (จากข้อ 3.1.2.2) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนท์ (จากข้อ 3.1.2.1) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที วัดการดูดแสงที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร อ่านปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นจากสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.7 วิธีเตรียมเฟอริดินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์

3.7.1 วิธีเตรียมอะมิโนเซลลูโลส

ละลายเมตาไนโตรเบนซิลออกซีเมทิล ไพริดิเนียมคลอไรด์ 1.4กรัม และโซเดียมอะซีเตท 0.5 กรัม ด้วย 90 % เอทานอล 20 มิลลิลิตร เติมผงเซลลูโลส cc 41 ทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส กำจัดไพริดีนที่เกิดขึ้นโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส 40 นาที และล้างด้วยเบนซีน 3 ครั้ง ๆ ละ 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง ล้างต่อใน Buchner funnel ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 5 ลิตร

เติม 20 % โซเดียมไฮโดรซัลไฟท์ 150 มิลลิลิตร ลงในเมตาไนโตรเบนซิลออกซีเมทิล เซลลูโลส อุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที เพื่อเปลี่ยนกลุ่มไนโตรให้เป็นกลุ่มอะมิโน

ล้างอะมิโนเซลลูโลสที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 3 % กรดอะซีติค และน้ำกลั่นจนกระทั่งไม่มีกลิ่นของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทำให้แห้งในภาชนะดูดความชื้น เก็บในภาชนะดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.7.2 วิธีเตรียมสารแขวนลอยอะมิโนเซลลูโลส

นำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 กรัมในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

ผสมกับสารละลายคิวปริคซัลเฟต 5 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ล้างตะกอนคิวปริคไฮดรอกไซด์ ที่เกิดขึ้นด้วยน้ำกลั่นประมาณ 2 ลิตร ละลายตะกอนให้หมดด้วยแอมโมเนีย 100 มิลลิลิตร เติมซูโครส 0.33 กรัม และผงอะมิโนเซลลูโลส (จากข้อ 3.7.1) 1 กรัม อย่างช้า ๆ คนสารละลายแขวนลอยนี้ 30 นาที เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมประมาณ 400 มิลลิลิตร เติม 10 % กรดซัลฟูริค จนกระทั่งสีของสารผสมแขวนลอยเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีฟ้าขุ่น

ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ๆ ละประมาณ 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ต้องใช้ภายใน 24ชั่วโมง)

3.7.3 <u>วิธีเชื่อมเฟอริตินเข้ากับอะมิโนเซลลูโลส</u>

เติม 2 M กรดไฮโดรคลอริก 50 มิลลิลิตรลงในสารแขวนลอย อะมิโนเซลลูโลส 25 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.7.2) เติม 1 % โซเดียมไนไตรท์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 0 – 3 องศาเซลเซียส 30 นาที เติมผลึกยูเรียเพื่อกำจัดกรดไนตรัส ตรวจสอบโดยใช้กระดาษสตาร์ชไอโอไดด์ ถ้ายังมีกรดไนตรัสอยู่จะเกิดสีน้ำเงินเข้ม

ล้างไดเอโซเซลลูโลสที่เกิดขึ้นด้วยน้ำเย็น 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 100 มิลลิลิตร และ 0.2 M บอเรทบัฟเฟอร์ pH 8.4 (จากข้อ 3.1.5.6) อีก 1 ครั้ง (100 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรด้วยบอเรทบัฟเฟอร์ pH8.4 ให้มีความเข้มข้นประมาณ 20 – 25 มิลลิกรัมของไดเอโซเซลลูโลส/มิลลิลิตร ตรวจสอบกลุ่มไดเอโซบนโมเลกุลของเซลลูโลส โดยหยดบีตา–แนบทอล (ละลายในบอเรทบัฟเฟอร์) 2 – 3 หยด ลงในสารละลายแขวนลอยไดเอโซเซลลูโลส 1 มิลลิลิตร ถ้ามีกลุ่มไดเอโซอยู่จะเกิดสีส้ม

เติมเฟอริตินจากม้ามของม้า 250 มิลลิกรัม ลงในไดเอโซเซลลูโลส 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 48 – 72 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว เติมไกลซีน 1 กรัม เพื่อทำปฏิกริยากับกลุ่มไดเอโซที่เหลือ

3.7.4 วิธีกำจัดเฟอริตินส่วนที่ไม่เชื่อมกับเซลลูโลส

ล้างเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ที่ได้จากข้อ 3.7.3 ด้วย 0.04M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ (จากข้อ3.1.5.7) 8 – 10 ครั้ง ๆ ละประมาณ 10 มิลลิลิตร และ 0.05M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (จากข้อ 3.1.5.8) 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ ใหม่ความเข้มข้นประมาณ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.8 วิธีผลิตแอนติเฟอริตินในกระต่ายทดลอง

นำเฟอริตินที่เตรียมได้จากข้อ 3.3 ปริมาณ 1 มิลลิกรัม (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) มาผสมกับ Freund ' s complete adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร และฉีดเข้ากระต่ายทดลองโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณหลัง 2 แห่ง และเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง 2 แห่ง

ฉีดซ้ำด้วยเฟอริตินที่ผสมกับ Freumd ' s incomplete adjuvant (1 : 1 โดยปริมาตร) ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ ติดตามแอนติเฟอริตินที่เกิดขึ้น โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหูมาแยกซีรัม เพื่อหาไตเตอร์ด้วยวิธีอิมมิวโนดิฟฟิวส์ชัน

เก็บซีรัมกระต่ายที่มีแอนติเฟอริตินที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

3.9 วิธีหาไตเตอร์ของแอนติเฟอริตินในซีรัมของกระต่าย

วิธีทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4 แต่เติมเฟอริตินจากตับของคน (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ลงในหลุมกลาง และเติมซีรัมกระต่ายที่เจือจางความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลุมรอบ ๆ

ไตเตอร์ของแอนติเฟอริตินในซีรัมกระต่าย คือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของซีรัมที่สามารถตรวจพบเส้นตะกอนของโปรตีนที่เกิดจากปฏิกริยาระหว่างเฟอริตินและแอนติเฟอริติน

3.10 วิธีติดฉลากแอนติเฟอริตินด้วยโซเดียมไอโอไดด์–125

3.10.1 วิธีเตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเฟอริติน

ล้างอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ 20 ไมโครลิตร ด้วย 0.3 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ (จากข้อ 3.1.6.1) 4 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร เติมซีรัมกระต่าย (ที่มีแอนติเฟอริติน) 400 ไมโครลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 – 4 วัน เขย่าเป็นครั้งคราว ล้างโปรตีนที่ไม่จำเพาะทิ้งด้วย 0.3 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.9% โซเดียมคลอไรด์ 4 ครั้ง ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เท่ากับปริมาตรก่อนล้าง แบ่งบางส่วนไปวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (ข้อ 3.6)

3.10.2 วิธีติดฉลากด้วยโซเดียมไอโอไดด์ – 125

ผสมแอนติเฟอริตินที่จับติดกับอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ (จากข้อ 3.10.1) 20 – 50 ไมโครลิตร (20 – 60 ไมโครกรัมของโปรตีน) โซเดียมไอโอไดด์ – 125 (1 มิลลิคูรี) 10 ไมโครลิตร และสารละลายคลอรามีน –ที (2.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร ให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เติมสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ (6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 10ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันทันที

3.10.3 วิธีเตรียมสารติดฉลากแอนติเฟอริตินให้บริสุทธิ์

นำสารติดฉลากจากข้อ 3.10.2 ล้างบนกระดาษกรองเบอร์ 41 (2 ชั้น) ที่เปียกชุ่มด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 (ที่เติมผลึกโซเดียมไอโอไดด์เล็กน้อย) และดำเนินขั้นตอนตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขั้นตอนการชะล้างสารติดฉลากแอนติเฟอริตินด้วยสารละลายต่าง ๆ

ส่วนที่	ชนิดสารละลายที่ใช้ล้าง	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)
1	0.05M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มี อัลบูมิน 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	200
2	กรดไฮโดรคลอริค pH 3	100
3	กรดไฮโดรคลอริค pH 2 (1)	4
4	กรดไฮโดรคลอริค pH 2 (2)	4
5	กรดไฮโดรคลอริค pH 2 (3)	100

หมายเหตุ สารละลายจากส่วนที่ 3 และ 4 เก็บลงใน 0.1 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.04 % โซเดียมเอไซด์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละส่วน ๆ ละ 10 ไมโครลิตร มานับปริมาณกัมมันตภาพรังสี

3.10.4 วิธีเก็บสารติดฉลากแอนติเฟอริติน – ไอโอดีน – 125

เติมเฟอริตินอิมมิวโนแอคสอบเบนท์ที่ล้างด้วย 0.05 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ทั้งหมด 5 ครั้ง ๆ ละ 3 มิลลิลิตร ปริมาณรวม 100ไมโครลิตร ลงในสารละลายส่วนที่ 3 และ 4 ของข้อ 3.10.3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 – 4 วัน นำสารละลายส่วนละ 10 ไมโครลิตร มานับปริมาณกัมมันตภาพรังสี

ส่วนที่เหลือล้างด้วย 0.05M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 4ครั้ง ครั้งละ 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เท่ากับปริมาตรก่อนล้าง แบ่งส่วนละ 10

ไมโครลิตร เพื่อนับปริมาณกัมมันตภาพรังสี คำนวณเปอร์เซนต์ที่แอนติเฟอริตินจับกับเฟอริตินอิมมิวโนแอคสอบเบนท์ แบ่งเก็บหลอดละ 2×10^6 cpm ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.10.5 <u>วิธีเตรียมสารติดฉลากแอนติเฟอริติน – ไอโอดีน 125 ให้อยู่ในรูปอิสระ</u>

นำสารติดฉลากจากข้อ 3.10.4 มาล้างบนกระดาษกรองเบอร์ 41 โดยใช้สารละลายตามตารางที่ 3

<u>ตารางที่ 3</u> ขั้นตอนการชะสารติดฉลากแอนติเฟอริตินให้อยู่ในรูปอิสระ

ส่วนที่	ชนิดของสารละลายที่ใช้ล้าง	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)
1	0.05M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อัลบูมิน)	40
2	กรดไฮโดรคลอริค pH 3.0	5
3	กรดไฮโดรคลอริค pH 2.5	3
4	กรดไฮโดรคลอริค pH 2.0	2

<u>หมายเหตุ</u> สารละลายในส่วนที่ 2 3 และ 4 เก็บลงใน 0.1 M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.04 % โซเดียมเอไซด์ ที่มีปริมาตร 5 3 และ 2 มิลลิลิตรตามลำดับ

นำสารละลายในแต่ละส่วน ๆ ละ 50 ไมโครลิตร มานับปริมาณกัมมันตภาพรังสี

3.11 การทดสอบปฏิกริยาทางอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์

รายละเอียดของการทดสอบคุณสมบัติ และหรือปริมาณสารติดฉลากแอนติเฟอริติน อิมมิวโนแอดสอบเบนท์ เวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา และอิทธิพลของบิลิรูบิน ฮีโมโกลบิน ที่อาจมีอยู่ในซีรัมตัวอย่าง จะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยขึ้นกับจุดประสงค์ของการทดลอง โดยมีหลักเกณฑ์ทั่วไป คือ ผสมสารต่าง ๆ ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รายละเอียดของการทำอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	หลอดปริมาณรังสีรวม	หลอดไม่มีสารมาตรฐาน	หลอดสารมาตรฐาน
สารติดฉลากแอนติเฟอริติน 0.05M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 4 กรัม/100 มิลลิลิตร	25	25	25
สารละลายมาตรฐาน	100	50	—
	—	—	50
ปล่อยให้เกิดปฏิกริยาที่อุณหภูมิ และเวลาที่พอเหมาะ			
อิมมิวโนดอดสอบเบนท์	—	50	50
ปล่อยให้เกิดปฏิกริยาที่ 2 ที่อุณหภูมิ และเวลาที่พอเหมาะ แล้วนำไปปั่นแยกส่วนใสออกมาหลอดละ 100 ไมโครลิตร เพื่อนับปริมาณกัมมันตภาพรังสี			

3.12 วิธีวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัม

การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัม ใช้หลักการของอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ (Miles และ Hales 1968) ตามวิธีของ Worwood และคณะ (Worwood และคณะ 1975) โดยเปลี่ยนแปลงรายละเอียดบางประการตามความเหมาะสม ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมด้วยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	หลอดปริมาณรังสีรวม	หลอดไม่มีสารมาตรฐาน	หลอดสารมาตรฐาน
สารติดฉลากแอนติเฟอริติน 0.05M เวอโรนาลบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่มีอัลบูมิน 4 กรัม/100 มิลลิลิตร	25	25	25
เฟอริตินมาตรฐาน (.313–20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร	100	—	—
ซีรัมตัวอย่าง	—	50	—
	—	—	50
ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกริยาอย่างสมบูรณ์ที่ 4 องศาเซลเซียส 18 – 24 ชั่วโมง			
อิมมิวโนแอคสอบเบนท์ (1 : 40)	—	50	50

ตารางที่ 5 (ต่อ) การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมด้วยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์

ตั้งทิ้งไว้ให้อิมมิวโนแอคสอบเบนท์ดูดซับสารติดฉลากแอนติเฟอริตินอิสระที่เหลืออยู่ ที่อุณหภูมิห้อง (26 – 28 องศาเซลเซียส) 30 นาที นำไปปั่นแยกอิมมิวโนแอคสอบเบนท์ ด้วยเครื่องไมโครฟิวจ์ 3 นาที แยกสารละลายส่วนใสหลอดละ 100 ไมโครลิตร มานับปริมาณกัมมันตภาพรังสี

ปริมาณเฟอริตินในซีรัมหาได้โดยเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอริตินมาตรฐาน

3.13 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณ

3.13.1 ความจำเพาะ (Specificity) ของแอนติเฟอริติน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.12 ตารางที่ 5 แต่ใช้สารละลายมาตรฐานที่ต้องการทดสอบปฏิกริยาข้ามชนิด (cross reaction) แทนเฟอริตินมาตรฐาน

คำนวณเปอร์เซนต์ของปฏิกริยาข้ามชนิดโดยวิธีของ Abraham (1969)

$$\% \text{ cross reaction} = \frac{\text{ความเข้มข้นเฟอริตินที่ 50 \% bound}}{\text{ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ 50 \% bound}} \times 100$$

3.13.2 ความไว (Sensitivity) ของวิธีวัดปริมาณ

ความไวในการวัดของกราฟมาตรฐาน หมายถึงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ที่ความเชื่อมั่น 95 %

3.13.3 ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวัดปริมาณ

การศึกษาความแม่นยำในการวัด ทำได้ 2 วิธีคือ

3.13.3.1 ดูความแตกต่างของปริมาณเฟอริตินในซีรัมตัวอย่างเปรียบเทียบ (control serum) เมื่อทดลองพร้อม ๆ กันหลายตัวอย่าง ในชุดเดียวกัน (within assay)

3.13.3.2 ดูความแตกต่างของปริมาณเฟอริตินในซีรัมตัวอย่างเปรียบเทียบ เมื่อทดลองคนละชุด (between assay)

3.13.4 ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวัดปริมาณ

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.12 แต่เติมสารละลายเฟอริตินมาตรฐานลงในซีรัมตัวอย่างเปรียบเทียบ โดยเติมปริมาณ 4 ระดับ คือ 1.25 2.5 5 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหาปริมาณตามวิธีในข้อ 3.13 และคำนวณหา % recovery ดังนี้

สมมติเติมเฟอริตินมาตรฐาน 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีซีรัมตัวอย่างเปรียบเทียบ เมื่อวัดปริมาณเฟอริติน และอ่านค่าของเฟอริตินจากกราฟมาตรฐาน

คำนวณความเข้มข้นของเฟอริตินที่เพิ่มขึ้น	x	ng/ml
ความเข้มข้นเฟอริติน 10 ng/ml วัดได้	x	ng/ml
ความเข้มข้นเฟอริติน 100 ng/ml วัดได้	$\frac{x}{10} \times 100$	ng/ml
ความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณเฟอริติน	10 x	%