วิธีทำ

1. การศึกษาเกี่ยวกับการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนจากเนื้อก้อนธัยรอยด์

1.1 เตรียม Plate สำหรับทำ Chromatography

Plate หนา 0.5 มิลลิเมตรของ Silica gel G. activate ที่ 100°C 1 ชั่วโมงแล้ว เก็บใน dessicator ที่มี silica gel เพื่อดูดความชื้นใช้ภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง

1.2 เตรียม Solvent system สำหรับทำ Chromatography

Solvent system ที่ 1 ประกอบด้วย Chloroform:n-Butanol:28% NH_3 อัตราส่วน 6 : 5 : 1 โดยปริมาตร เขย่าแรง ๆ ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 12 ชั่วโมงแล้ว แยกเอาชั้นล่างมาใช้

Solvent system ที่ 2 ใช้ t-Amyl alcohol:Dioxane:6N NH_4OH อัตราส่วน 1 : 3 : 1 โดยปริมาตร

Solvent system ที่ 3 ใช้ Ethyl acetate:Methanol: 6N NH_4OH อัตราส่วน 5 : 2 : 3 โดยปริมาตรแล้ว แยกเอาชั้นบนมาใช้

1.3 เตรียม Chromatography ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน

เตรียมธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน MIT, DIT, T_3 และ T_4 ด้วยตัวทำละลาย methanol : ammonia (9:1) จนกระทั่งมีความเข้มข้นชนิดละ 0.33 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเตรียมน้ำยาผสมของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน MIT + DIT + T_3+T_4 โดยให้แต่ละสารมีความเข้มข้น 0.33 ไมโครกรัมต่อ5ไมโครลิตรของสารละลายผสม เช่นเดียวกัน

นำสารละลายแต่ละชนิด และสารละลายผสมของฮอร์โมนทั้ง 4 ชนิด ขีดลงบน plate ให้เป็นแถบยาวประมาณ 1.5 เซ็นติเมตร (ปริมาตร 5 ไมโครลิตร) นำไป develop ใน chomatographic tank ที่กรุด้วยกระดาษกรองซึ่งชุ่มไปด้วย solvent system ที่ใช้ ให้ solvent เคลื่อนไปได้ไกลประมาณ 16-17 เซ็นติเมตร ทำให้แห้งด้วยลมเป่าแล้วเก็บใน

dessicator ที่มี silica gel เพื่อดูดความชื้น ประมาณ 12 ชั่วโมงจึงนำมาทำให้เกิดสีด้วยน้ำยาชัด FFCA

1.4 <u>การสกัดธัยรอยด์ฮอร์โมนจากเนื้อต่อมธัยรอยด์ โดยการผ่าน Dowex resin</u> ตามวิธีของ Dimitriadou และคณะ,1966 ดังนี้ คือ นำเนื้อเยื่อธัยรอยด์จากตู้เย็นช่องแข็งเลาะพังผืดและไขมันออก, ฝาน เนื้อเยื่อด้วยมีดบางตัดให้บางที่สุดเท่าที่จะทำได้ เป็นจำนวน300 มิลลิกรัม บดกับ Thiourea 0.008 กรัม ใน veronal buffer pH 8.6 ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมของเนื้อเยื่อ ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตรของ veronal buffer เติม enzymes คือ Pancreatin, Erepsin และ Hyaluronidase อย่างละ 0.06 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ขวดจุกทองเหลืองปิดให้แน่น นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ ตลอดเวลาที่ incubate แล้วนำไปปั่นที่ 1000 x g. เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง ดูดเอาเฉพาะน้ำสีเหลืองใสมาผ่าน column แก้ว (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซ็นติเมตร) ซึ่ง pack ด้วย Dowex resin (acetate form) pH 5.6 (Galton และ Pitt-Rivers, 1958) สูง 6 เซ็นติเมตร ไล่สารที่ไม่บริสุทธิ์เช่น พวกโปรตีนออกโดยล้างด้วย acetate buffer pH 3.6 (Galton และ Pitt-Rivers,1959) แล้วจึง elute ธัยรอยด์ฮอร์โมนที่อยู่ใน resinออก โดยใช้ acetate buffer pH 3.0, 2.2, 1.4 อย่างละ 15 มิลลิลิตร รองรับ eluate แต่ละส่วนมารวมกัน eluate นี้จะมีธัยรอยด์ฮอร์โมนของพวก MIT, DIT, T_3 และ T_4 ออกมาตามลำดับ (Galton และ Pitt-Rivers, 1959) และท้ายที่สุดจึงใช้กรดกลาเซียลอะซีติก 15 มิลลิลิตร แล้วนำ eluate ทั้งหมดไปทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศและแกสไนโตรเจน เมื่อแห้งแล้วเติม deionized water 2-3 มิลลิลิตร ทำให้แห้งอีกครั้งหนึ่ง ทั้งนี้เพื่อต้องการขจัดกรดอะซีติคออกให้หมด เติม methanol:ammonia(9:1) จำนวน 0.6 มิลลิลิตร ลงใน dried extract นำไปปั่นที่ 1000xg. เวลา 5 นาที ดูดใช้เฉพาะน้ำใสสีน้ำตาล เพื่อแยกโดย Chromatography ต่อไป

1.5 <u>การสกัดธัยรอยด์ฮอร์โมนจากเนื้อต่อมธัยรอยด์ โดยการผ่านSephadex LH-20</u> (ดัดแปลงจาก Nauman และคณะ, 1967) แช่ Sephadex LH-20 ขนาด 25-100 ไมครอน

ในdeionized water จนกระทั่งพองตัวเต็มที่ ใส่ใน column เช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น สูง 4 เซ็นติเมตร ต่อปริมาตรของสารที่ต้องการสกัด 5 มิลลิลิตร ควรปรับ pHของสารที่ต้องการสกัดให้เป็น 5.6 ด้วยกรดเกลือเจือจาง คนให้เข้ากันและนำไปปั่นที่ 1000 x g. เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสสีเหลืองอ่อนมาผ่าน Sephadex LH-20 column ในอัตราการไหลช้าที่สุด เพื่อให้ Sephadex มีโอกาสจับธัยรอยด์ฮอร์โมนในสารที่ต้องการสกัดได้อย่างเต็มที่ เมื่อผ่านหมดแล้วใช้ deionized water 35 มิลลิลิตรล้างขจัดสิ่งที่ไม่บริสุทธิ์ออก แล้ว elute ธัยรอยด์ฮอร์โมนออกจาก Sephadex โดยใช้ methanol : ammonia (9:1) จำนวน 15 มิลลิลิตร ส่วนตะกอนขาวที่เหลือจากการปั่นครั้งแรก นำมาเติม methanol: ammonia (9:1) ปั่นที่ 1000 x g. เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาแต่น้ำใสสีเหลืองอ่อนเทลงใน Sephadex column อีกครั้งหนึ่ง เก็บรวบรวมน้ำยาที่รองรับได้ทั้งหมดมาทำให้แห้งโดยใช้ลมเป่าที่อุณหภูมิ 37° C เติม methanol : ammonia 0.6 มิลลิลิตรลงใน dried extract ปั่นที่ 1000 x g. 5 นาที ดูดน้ำใสสีเหลืองมา เพื่อแยกโดย chromatography ต่อไป

1.6 <u>การทำ Chromatography ของธัยรอยด์ฮอร์โมนที่สกัดจากเนื้อต่อมธัยรอยด์เปรียบเทียบกับธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน</u>

นำสารละลายของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน ที่ประกอบด้วย MIT + DIT + T_3 และ T_4 จำนวน 5 ไมโครลิตร มาขีดให้เป็นแถบยาวบน TLC plate จะมีความเข้มข้นของฮอร์โมนนี้แต่ละชนิดเท่ากับ 0.33 ไมโครกรัม ในระดับเดียวกันแต่ห่างจากแถบที่กล่าวประมาณ 1 เซ็นติเมตร ขีดแถบของธัยรอยด์ฮอร์โมนที่สกัดได้จากเนื้อต่อมธัยรอยด์ จำนวน 5 ไมโครลิตรเช่นเดียวกัน นำไป develop ใน solvent system ที่อยู่ใน chromatographic tank ให้ solvent เคลื่อนที่ไปประมาณ 16-17 เซ็นติเมตร ใช้ลมเย็นเป่าจนแห้ง เก็บใน dessicator ที่มี silica gel คอยดูดความชื้น เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จึงนำมาพ่นให้เกิดสีด้วยน้ำยา FFCA

1.7 <u>การทำให้เกิดสีด้วยน้ำยาชัด FFCA</u> (Gmelin และ Virtanen, 1959) จะเกิดแถบยาวสีน้ำเงินในบริเวณที่มีธัยรอยด์ฮอร์โมน ส่วนพื้น (background) จะมีสีเหลืองอ่อน แต่ถ้าปล่อยไว้ให้แห้งหรือนำไปอบที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ส่วนพื้นจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอ่อน

2. <u>การศึกษาวิธีทำเพื่อหา Thyroxine-Binding Globulin Capacity (TBG capacity) โดยวิธี Electrophoresis</u>

ดูดซีรั่มของคนไข้ผสมกับ T_4 - ^{125}I จนได้ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไป incubate ที่ 37° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปขีดให้เป็นเส้นยาวบน Sepraphore III ที่แช่จนพองตัวเต็มที่ใน veronal buffer pH 8.6 รีบนำไปวางใน Gelman electrophoresis chamber เปิดกระแสไฟ 20 volt ต่อ 1 แผ่นของ Sepraphore ขนาด 2 x 17 เซ็นติเมตร เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง นำออกไปย้อมสีและทำ autoradiography

2.1 <u>การย้อมสี</u> TBG electrophoresis แช่ Sepraphore ที่ต้องการย้อมลงใน Ponceau S.solution (ดังได้กล่าวแล้วในข้างต้น) เป็นเวลาอย่างน้อยที่สุด 5 นาที ล้างในกรดอะซีติค 5 % เป็นเวลา 1 นาที จะเห็นแถบต่าง ๆ ของ โปรตีน ใช้กรรไกรตัดตรงช่องระหว่าง α_1 - α_2 -globulins ใส่ลงในขวดวัด ขนาด 3 x 10 เซ็นติเมตร และเขียน "TBG" ส่วนแถบของ albumin, beta- และ gamma-globulins รวมอยู่ในขวดเดียวกันและเขียนว่า "other-fractions" ตัดส่วนที่ไม่ปรากฏว่ามีแถบใด ๆ อยู่ลงในขวดที่เขียนว่า background (bkg) เติมกรดอะซีติคเข้มข้นลงไปขวดละ 2มิลลิลิตร เขย่าจนกระทั่งละลายหมด นำไปวัดกัมมันตภาพรังสีด้วย Well-scintillation detector คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ TBG capaticy จากสูตร (Balfour & Tunnicliffe, 1960)

$$\% \text{ TBG capacity} = \frac{(\text{TBG} - \text{bkg}) \times 100}{(\text{TBG} - \text{bkg}) + (\text{other fractions} - \text{bkg})}$$

2.2 <u>การทำ autoradiography ของ TBG electrophoresis</u>,expose Sepraphore บน Fuji Medical X-ray film ใน casette เป็นเวลา

1 สัปดาห์ นำ film ไปล้างในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Metol กับ Hydroquinone (Hauff, 1891) และสารละลาย sodium thiosulfate เป็น fixing agent ส่วน Sepraphore นั้นนำไปย้อมสี Ponceau S.solution และล้าง ส่วนพื้นด้วยกรดอะซีติค 5 % สามครั้ง ต่อไปทำให้ใสและติดสีเข้ม โดยแช่ใน methanol 1 นาที แล้วจุ่มลงในกรดอะซีติค 10 % methanol วางพาดบนกระจกที่สะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60° C ประมาณ 15นาที เปรียบเทียบกับ film ที่ล้างแล้ว จะเห็นรอยแถบดำเรือนอยู่ระหว่างแถบของ α_1 และ α_2-globulins แถบเข้มที่สองอยู่ตรงกับ albumin อาจเห็นแถบเข้มที่สามอยู่เหนือ albumin เล็กน้อย คือ pre-albumin ซึ่งเรียกว่า Thyroxine-binding pre-albumin (TBPA)