



4.1 การเตรียมเฟอริตินจากตับของคน

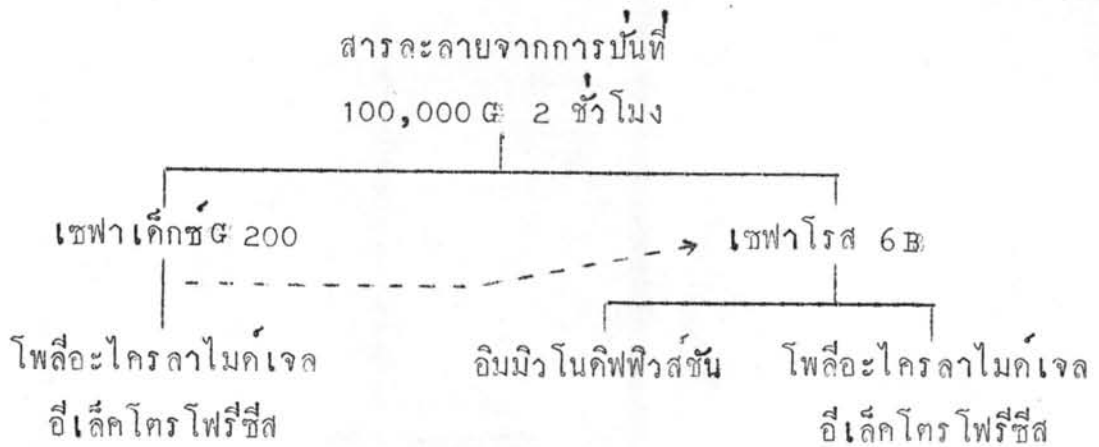
4.1.1 การสกัดแยกเฟอริตินจากเนื้อเยื่อตับ

เมื่อนำเนื้อเยื่อตับของคนมาสกัดแยกตามวิธีในข้อ 3.3.1 - 3.3.3 หน้า 30 พร้อมทั้งเพิ่มความบริสุทธิ์ของเฟอริตินโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50 % และการปั่นด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100,000 G และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยโพลีอะโครลาไมด์เจลอีเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 3.5 หน้า 34 ผลปรากฏว่าการใช้แรงหนีศูนย์กลาง 100,000 G สามารถกำจัดโปรตีนขนาดเล็กที่อาจปนอยู่ในสารละลายสกัดตับ ดังรูปที่ 11 และ 12 แต่อย่างไรก็ตามยังปรากฏโปรตีนขนาดใหญ่ที่ไม่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบปนอยู่เล็กน้อย ซึ่งจำเป็นต้องกำจัดทิ้ง การกำจัดโปรตีนเจือปนส่วนนี้อาจทำได้โดยวิธีการกรองผ่านเจลที่เหมาะสมกับขนาดโมเลกุลของโปรตีนเจือปน และเฟอริตินที่มีอยู่ในสารละลาย

4.1.2 การเตรียมเฟอริตินให้บริสุทธิ์ด้วยการกรองผ่านเจล

จากสารละลายที่ได้จากการใช้แรงหนีศูนย์กลาง 100,000 G ซึ่งมีโปรตีนขนาดใหญ่ที่ไม่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบเจือปนอยู่ เมื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับผลการแยกเฟอริตินออกจากโปรตีนเจือปนด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G 200 และเซฟาโรส 6 B ตามขั้นตอนในรูปที่ 10

ผลปรากฏว่าเมื่อใช้เซฟาเด็กซ์ G 200 จะได้เฟอริตินอยู่ในสารละลายโปรตีนส่วนที่ 1 (F_{G 1}) ที่เก็บได้จากคอลัมน์ และสามารถแยกโปรตีนที่มีโมเลกุลเล็กกว่าเฟอริตินออกได้ (รูปที่ 13) แต่เมื่อนำสารละลายส่วนแรก

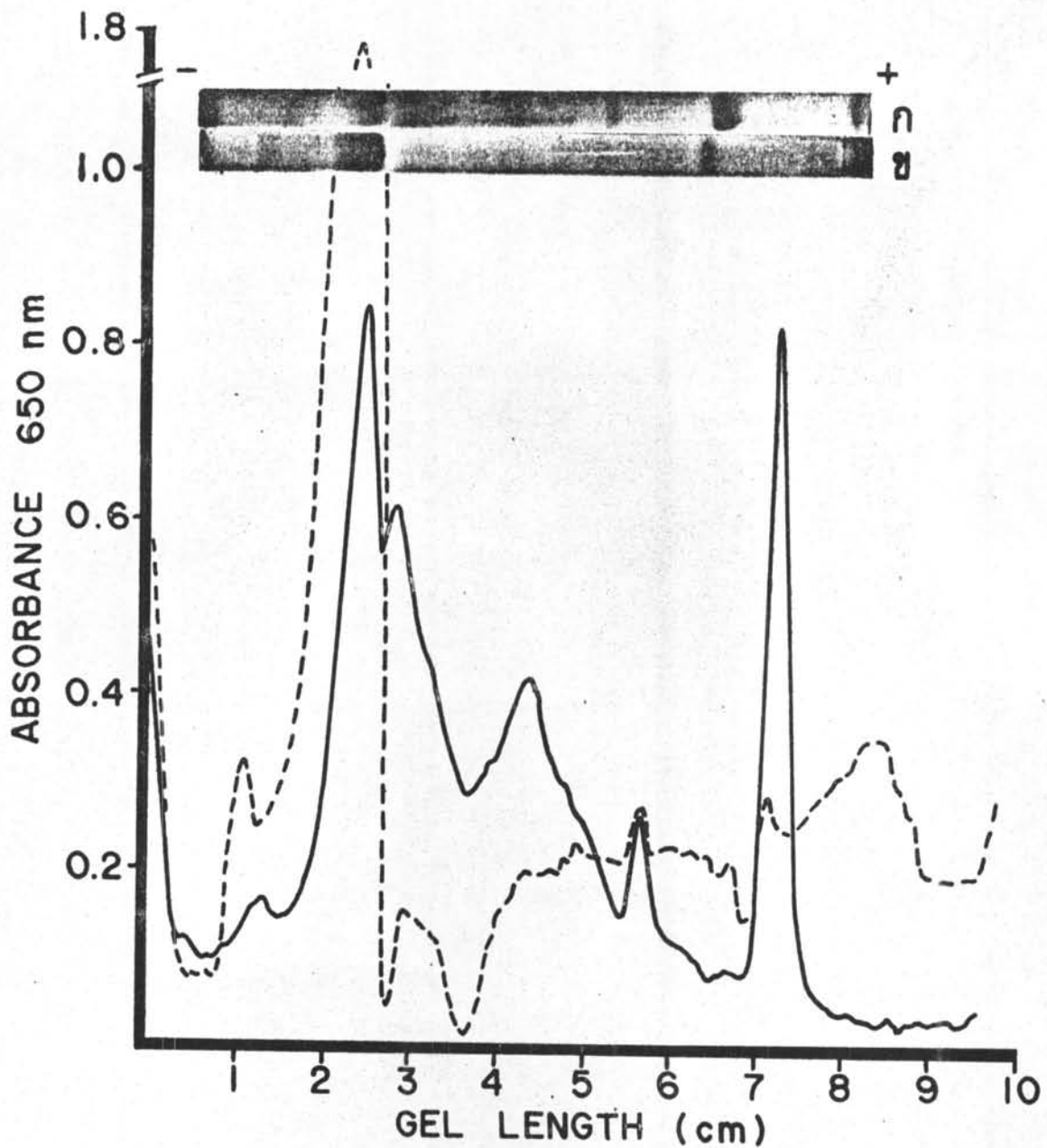


รูปที่ 10 ขั้นตอนการ เตรียมเฟอริทินและการทดสอบความบริสุทธิ์

นี้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็กโตรโฟเรซิส พบว่ายังมีโปรตีนขนาดใหญ่ที่ไม่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบปรากฏอยู่ในบริเวณส่วนต้นของอะไครลาไมด์เจล (ขั้วลบ) ดังรูปที่ 14 เหมือนกับสารละลายก่อนการกรองผ่านเซฟาเด็กซ์ G 200

สำหรับการแยกด้วยคอลัมน์เซฟาโรส 6 B ให้ผลดังรูปที่ 15 เมื่อทดสอบโดยวิธีอิมมิวโนคิฟิเวชัน พบว่าเฟอริทินอยู่ในสารละลายโปรตีนส่วนที่ 3 (๓) ที่เก็บได้จากคอลัมน์ (รูปที่ 16) เมื่อนำสารละลายโปรตีนส่วนที่ 3 มาแยกด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็กโตรโฟเรซิส ไม่พบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าเฟอริทินเจือปนอยู่ (รูปที่ 17)

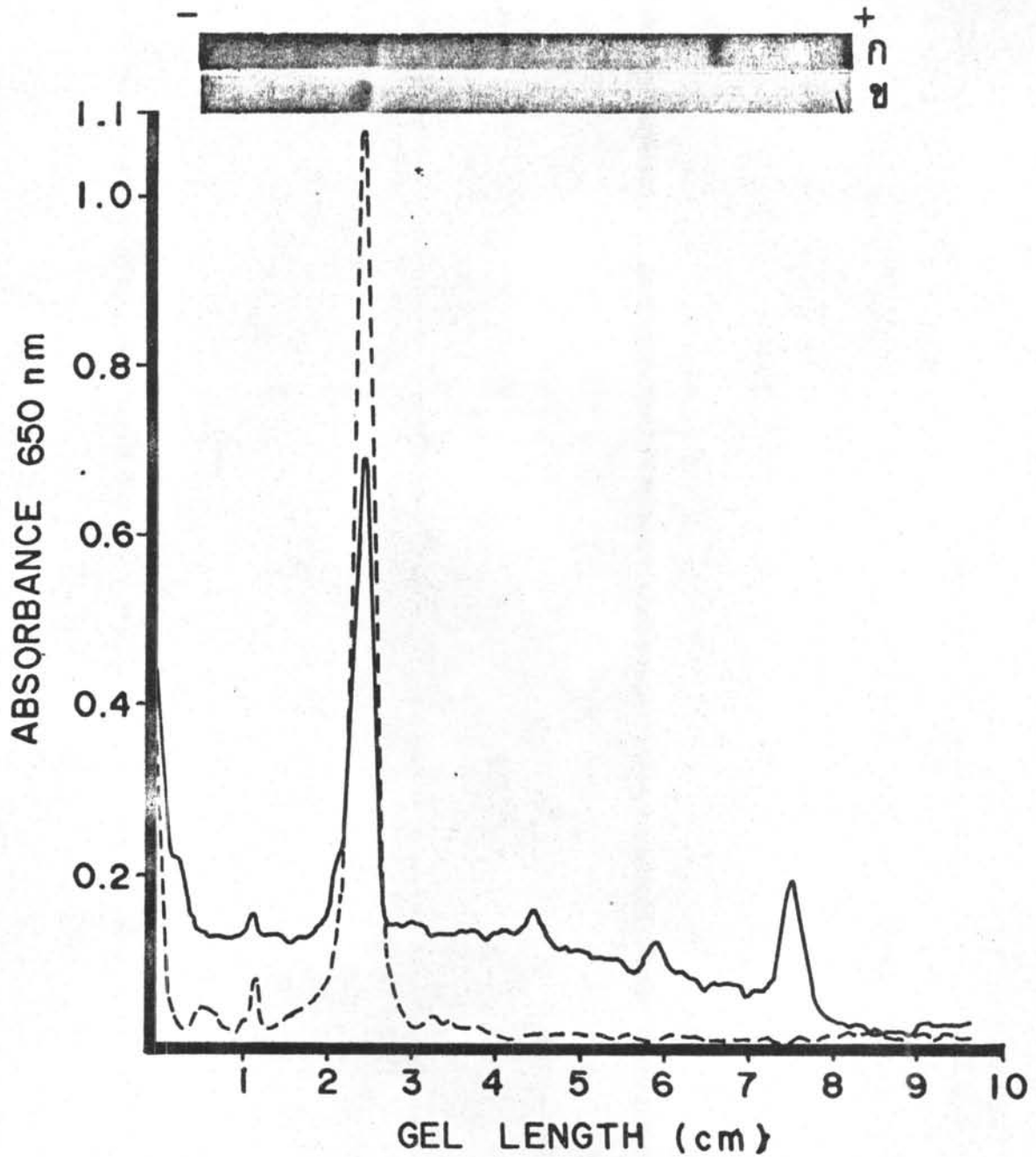
เนื่องจากเฟอริทินมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าความสามารถสูงสุด ที่คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G 200 จะแยกได้ เฟอริทินจึงอยู่ในสารละลายส่วนที่ 1 ซึ่งอาจมีโปรตีนอื่นเจือปนอยู่ โดยเฉพาะโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงหรือขนาดใหญ่กว่าเฟอริทิน ผู้รายงานจึงศึกษาต่อ โดยนำสารละลายโปรตีนส่วนที่ 1 จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G 200 มาผ่านลงในคอลัมน์เซฟาโรส 6 B พบว่าสามารถแยกโปรตีนออกได้มากกว่า 1 ชนิด (รูปที่ 18) และเฟอริทินยังคงผ่านออกจากคอลัมน์เซฟาโรส 6 B ที่ตำแหน่งเดิม โดยมีโปรตีนเจือปนผ่านออกจากคอลัมน์ใน สารละลาย



รูปที่ 11 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50% แยกโดยวิธีอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ก. _____ ย้อมโปรตีนด้วย 1% อะมิโดแบล็ค

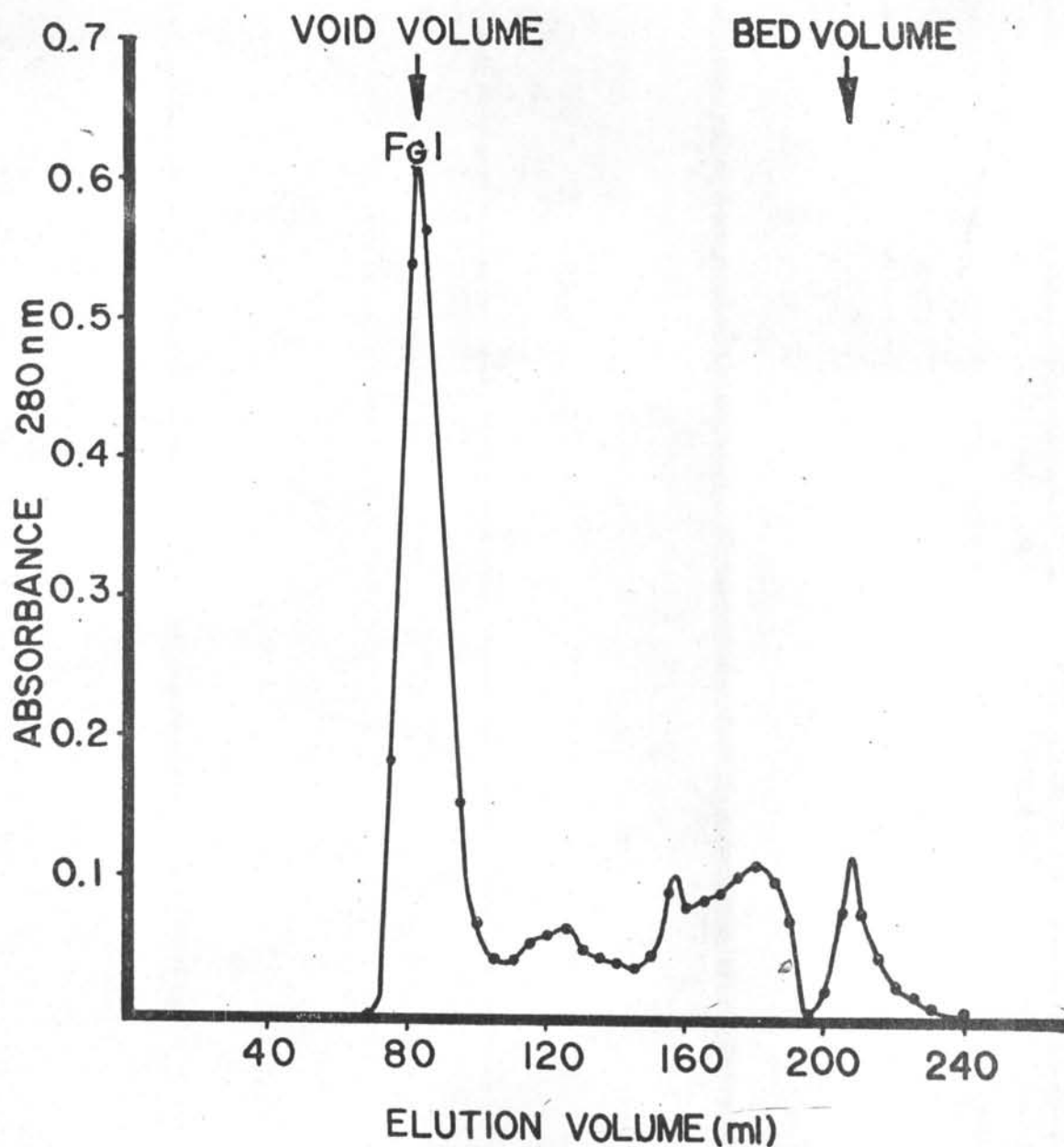
ข. ย้อมเหล็กด้วยสีปรัลเขียนบลู



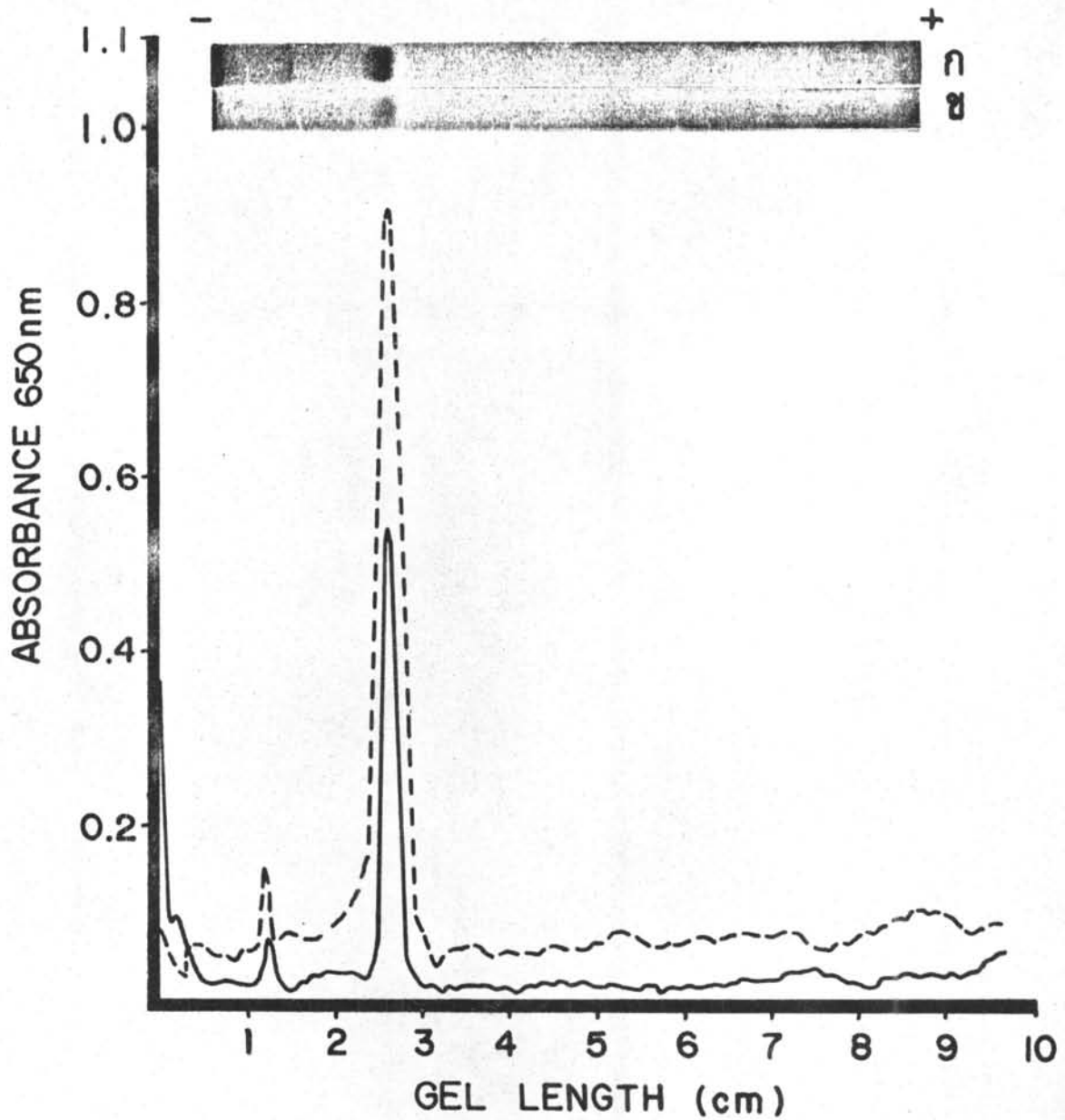
รูปที่ 12 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากการปั่นลารละลายด้วยแรง
หนีศูนย์กลาง 100,000 G แยกโดยเฟลโอะโครลา-
ไมด์เจลอีเล็กโตรโฟรีซิส

ก. _____ ย้อมโปรตีนด้วย 1% อะมิโดแบล็ค

ข. _____ ย้อมเหล็กด้วยดีปรัลเขียนบลู



รูปที่ 13 ผลการแยกโปรตีนในสารละลายที่ได้จากการปั่นเก็บด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100,000 G โดยคอลัมน์-เซฟาเด็กซ์ G 200 ชะด้วย 0.05 M เวย์โรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5

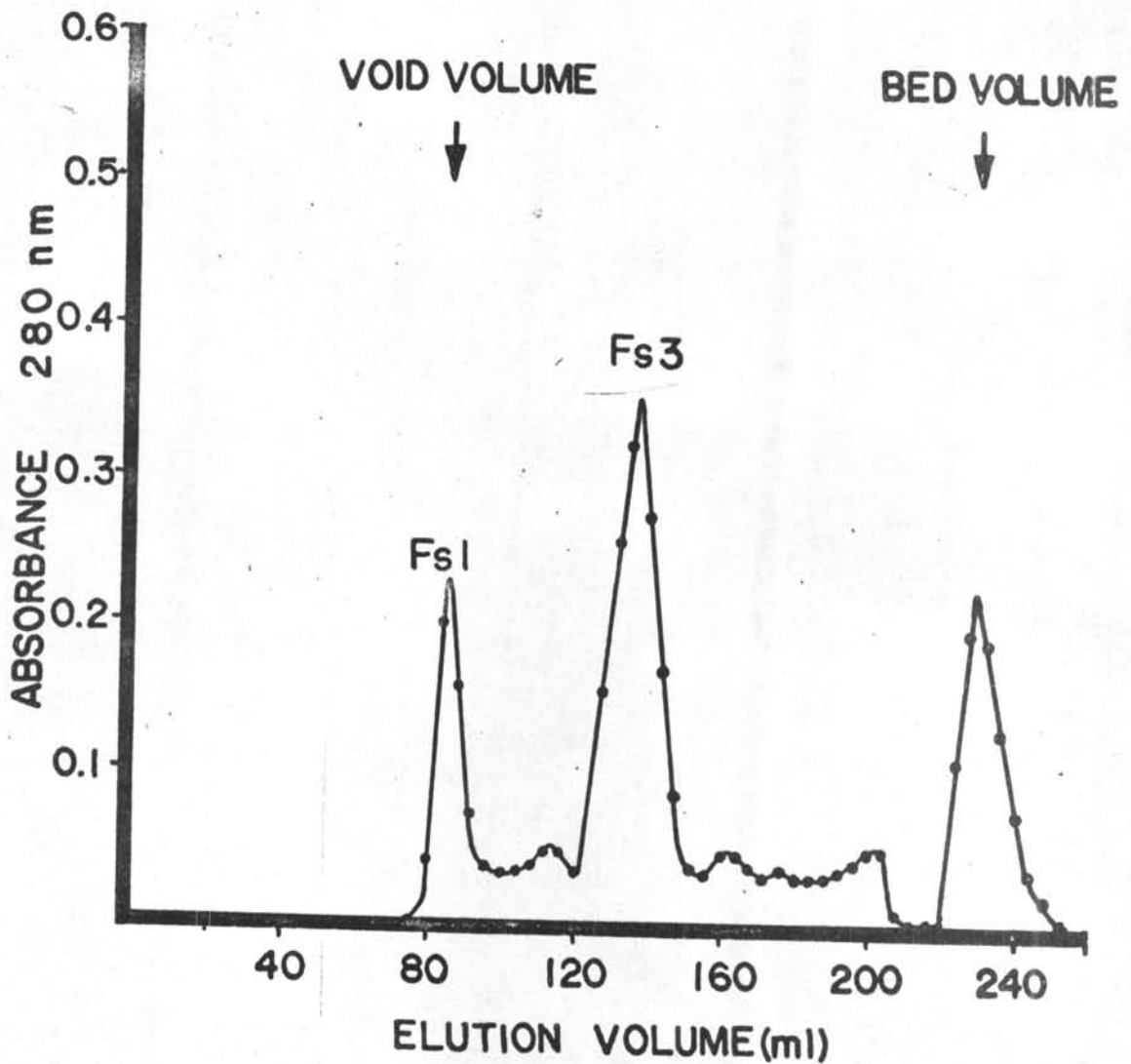


รูปที่ 14

รูปแบบของโปรตีนในสารละลายส่วนที่ 1 ที่เก็บได้ - จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G 200 แยกโดยโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

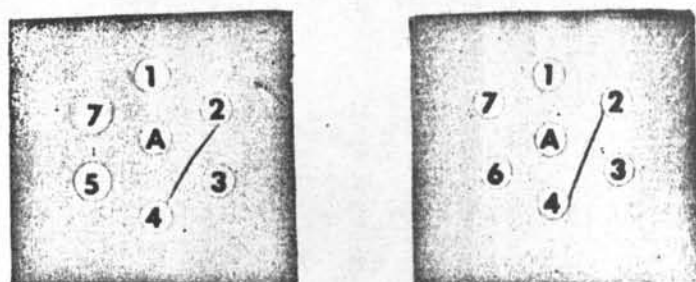
ก. _____ ย้อมโปรตีนด้วย 1% อะมิโดแบล็ค

ข. ย้อมเหล็กด้วยดีปรัลเขียนบลู



รูปที่ 15

ผลการแยกโปรตีนในสารละลายที่ได้จากการปั่นเก็บด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100,000 G โดยใช้คอลัมน์เซฟาโรล 6B ชะด้วย 0.05M เวย์ไรนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5

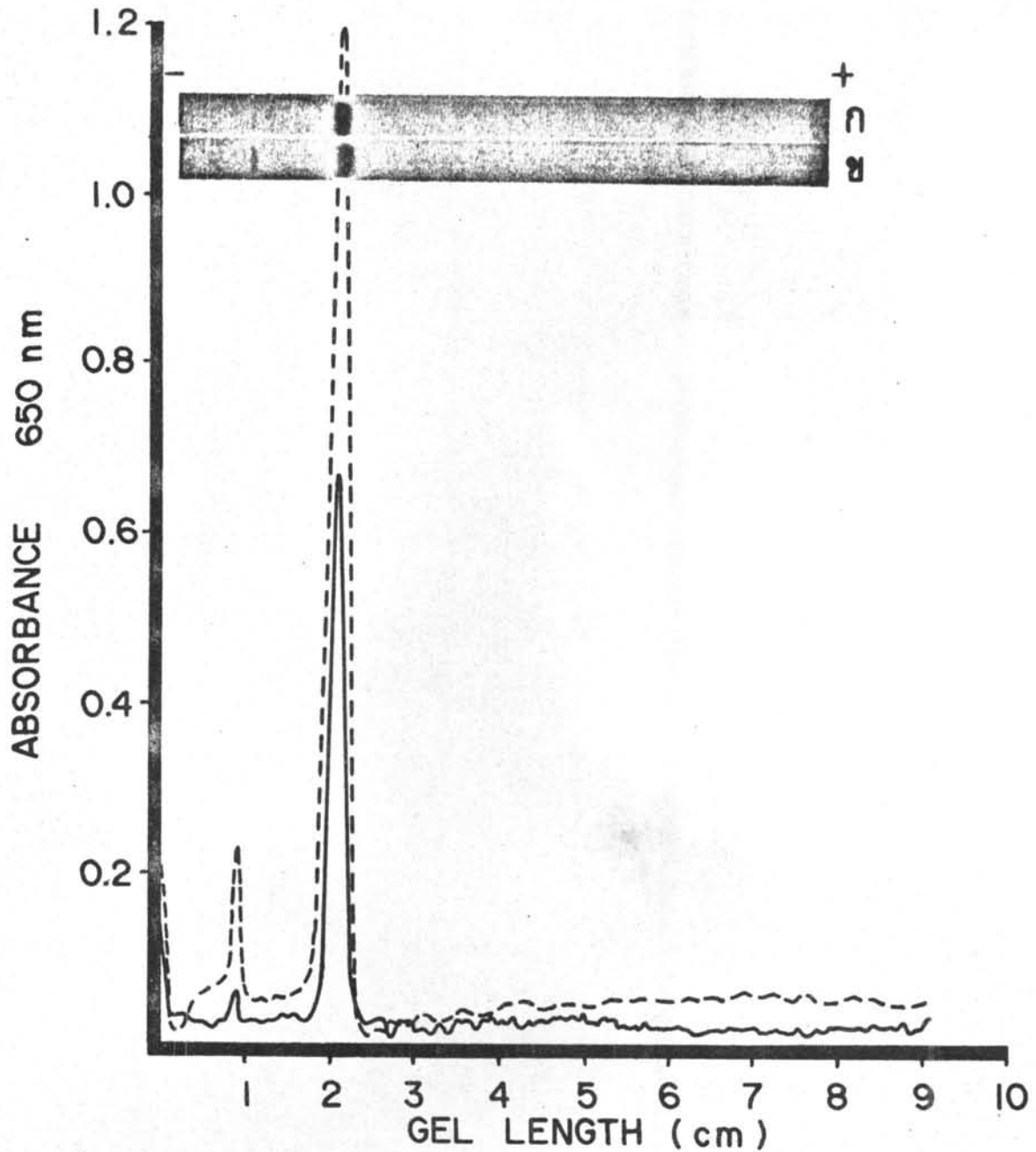


รูปที่ 16 อิมมิวโนดิฟฟิวส์ชันเจลแผลดงตำแหน่งของเฟอริติน
ที่เก็บได้จากคอลัมน์เซฟาโรล 6 B

A = หลุมที่ใส่แอนติเฟอริติน

1-7 = หลุมที่ใส่สารละลายที่เก็บได้ล่วนที่

Fs1 - Fs7

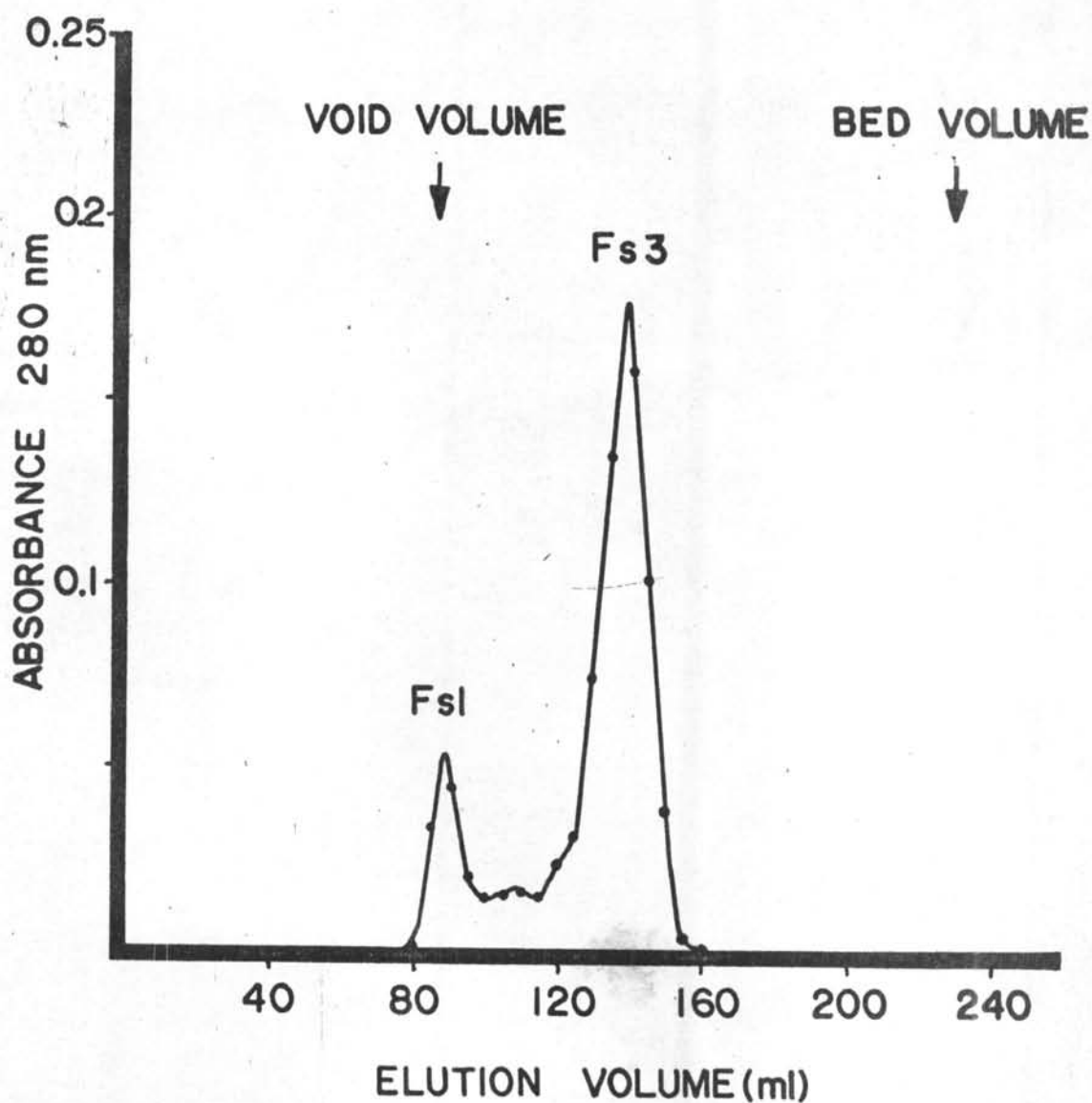


รูปที่ 17

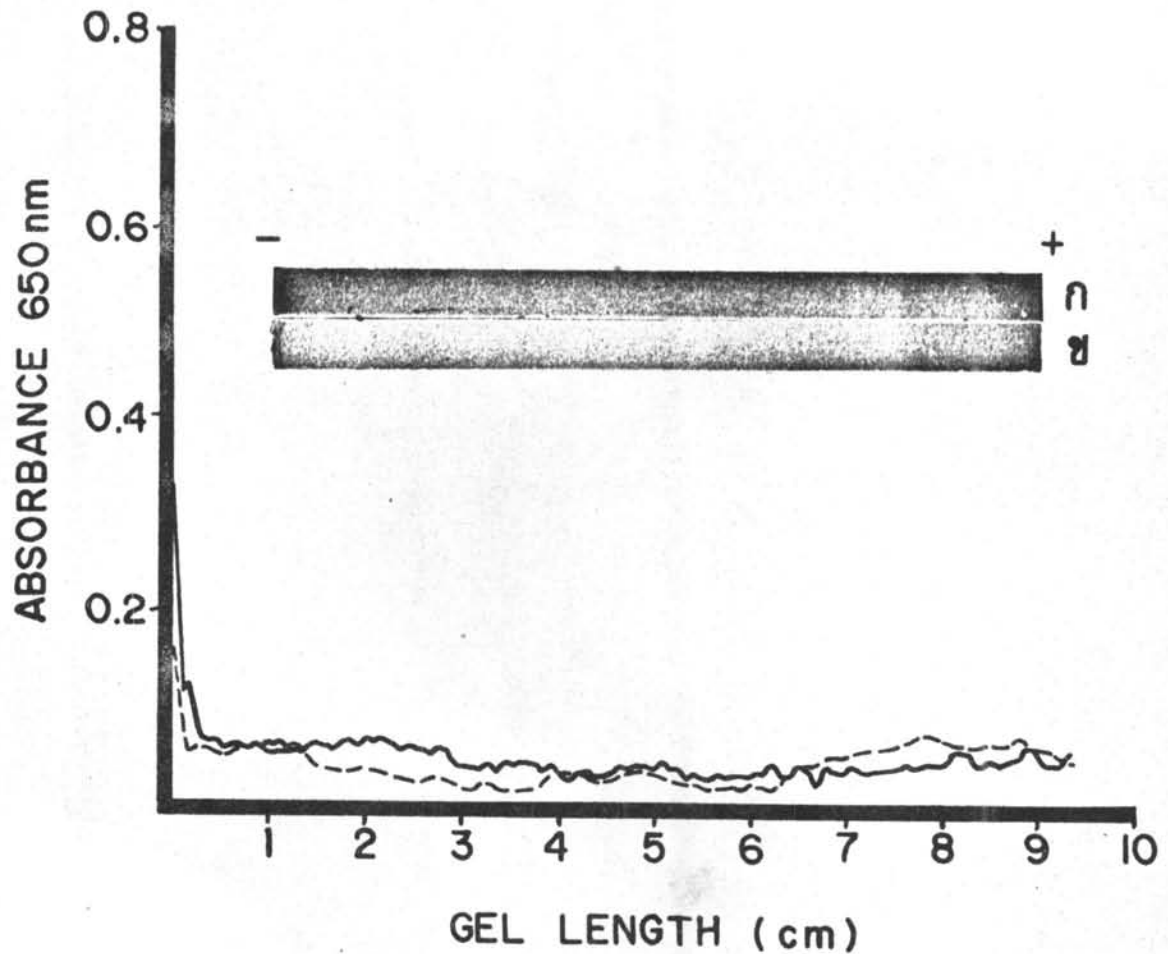
รูปแบบของโปรตีนในลารละลายส่วนที่ 3 (Fs 3) ที่เก็บได้จากคอลัมน์เซฟารอล 6B แยกโดยโพลีอะโครลาไมด์เจลอีเล็กโตรโฟรีซิส

ก. _____ ย้อมโปรตีนด้วย 1% อะมิโดแบล็ค

ข. ย้อมเหล็กด้วยสีปรัลเขียนบลู



รูปที่ 18 ผลการแยกโปรตีนในสารละลายส่วนที่ 1 (Fs1) ที่
เก็บได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G 200 โดยใช้
คอลัมน์เซฟาโรล 6 B ชะด้วย 0.05 M -
เวอรีนาลบัฟเฟอร์ pH 7.5



รูปที่ 19 รูปแบบของโปรตีนในลารละลายส่วนที่ 1 ($F_s 1$) ที่
 เก็บได้จากคอลัมน์เซฟาโรล 6B แยกโดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
 ก. _____ ย้อมโปรตีน ด้วย 1% อะมิโคแบล็ค
 ข. ----- ย้อมเหล็กด้วยลิปรัลเขียนบลู

โปรตีนส่วนที่ 1 (F_S 1) และเมื่อนำมาตรวจโดยใช้ ฟิล์มอะโรกราไมด์เจดี้ เล็คโตรไฟรีซีส พบโปรตีนนี้ในบริเวณส่วนต้นของเจล (รูปที่ 19) ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่าเซฟาโรส 6B สามารถกำจัดโปรตีนเจือปนที่มีขนาดใหญ่กว่า เฟอร์ตินได้ดีกว่าเซฟาเล็กซ์ G200 ดังนั้นในการเตรียมเฟอร์ตินครั้งต่อ ๆ ไป จึงใช้คอลัมน์เซฟาโรส 6B เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์

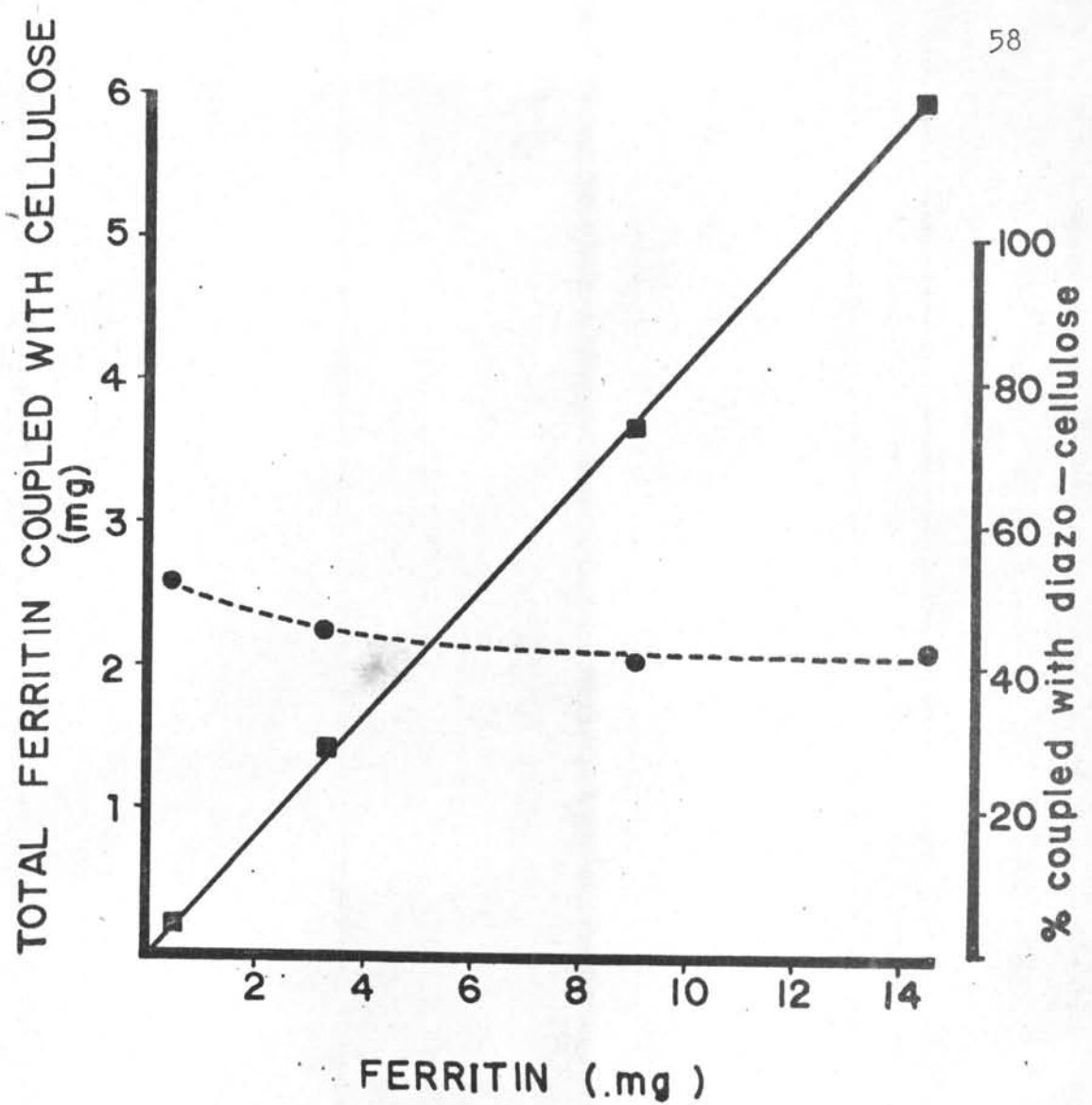
การเตรียมเฟอร์ตินตามวิธีที่กล่าวมานี้ สามารถสกัดแยกเฟอร์ตินได้ประมาณ 15 มิลลิกรัม/น้ำหนักตับสด 100 กรัม

4.2 การเตรียมเฟอร์ตินอิมิวโนแอสอบเบนท์

นำโคเอโซเซลลูโลสที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.7 หน้า 36 - 37 มาทดลองทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับเฟอร์ตินจากม้ามของมา โดยใช้ปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0.5 - 14.5 มิลลิกรัม/โคเอโซเซลลูโลส 1 มิลลิกรัม ผลปรากฏว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของเฟอร์ตินมากขึ้นปริมาณที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อคำนวณแล้วพบว่าเฟอร์ตินที่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของเซลลูโลส อยู่ในระหว่าง 40 - 50 % ของเฟอร์ตินทั้งหมดที่ทุก ๆ ระดับความเข้มข้นของเฟอร์ตินที่ใช้ทำปฏิกิริยา (รูปที่ 20)

ในการเตรียมเฟอร์ตินอิมิวโนแอสอบเบนท์สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป ใช้เฟอร์ตินจากม้ามของมา 10 กรัม/โคเอโซเซลลูโลส 1 มิลลิกรัมเนื่องจากสะดวกในการเตรียม และให้อิมิวโนแอสอบเบนท์ที่มีเฟอร์ตินมากพอที่จะใช้กักจับแอนติเฟอร์ติน

เฟอร์ตินอิมิวโนแอสอบเบนท์ที่เตรียมได้ สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเฟอร์ติน และการแยกสารคัดหลั่งจากแอนติเฟอร์ตินอิสระออกจากรูปที่รวมตัวกับเฟอร์ตินที่มีอยู่ในตัวอย่าง



รูปที่ 20

ความฉลาดของเฟอริตินในการเชื่อมต่อกับโมเลกุลของไดอะโซเซลลูโลส

- % เฟอริตินที่เชื่อมต่อกับเซลลูโลส
- ปริมาณเฟอริตินที่เชื่อมต่อกับเซลลูโลส

4.3 การผลิตแอนติเฟอร์รีนในกระต่ายทดลอง

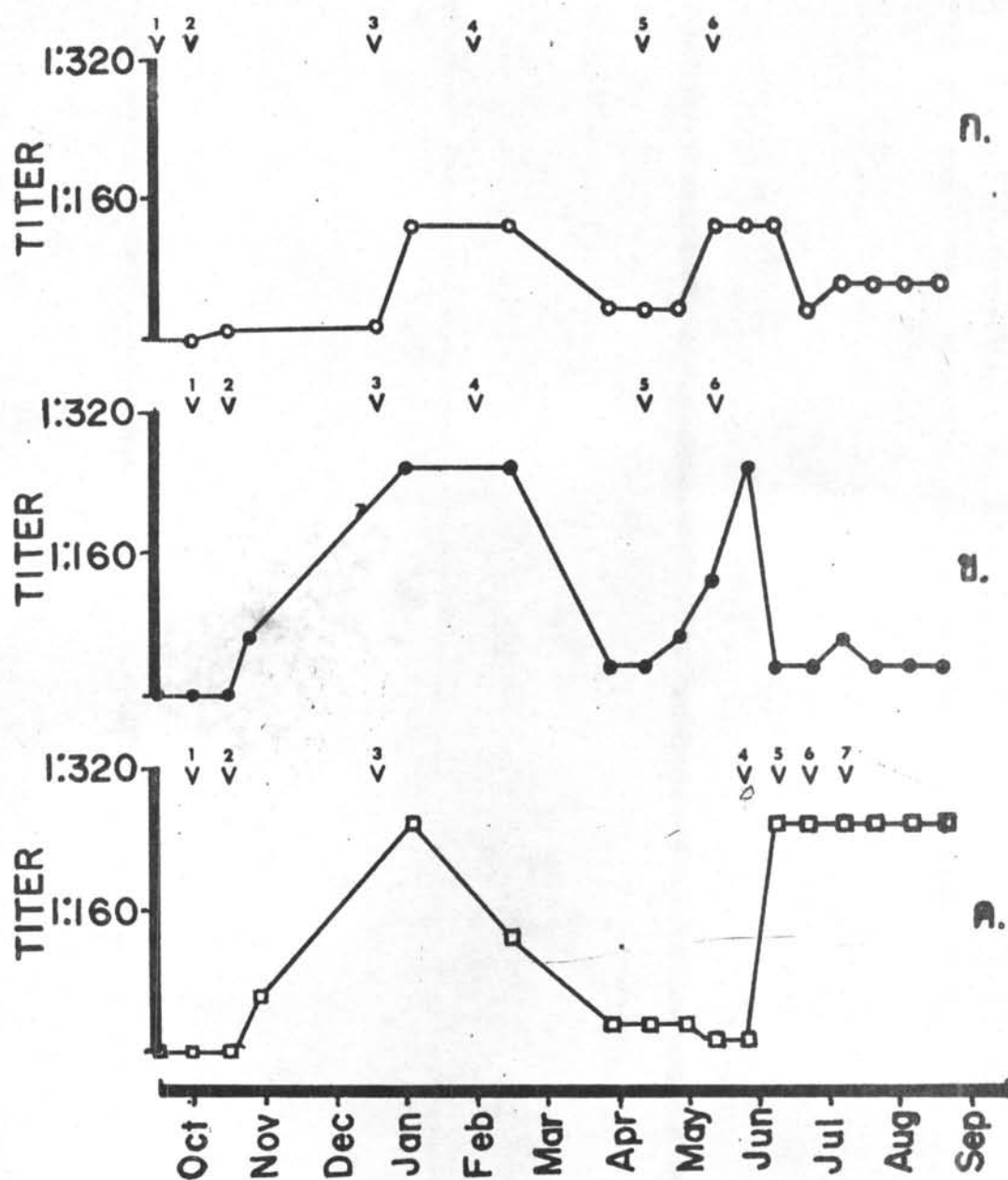
เฟอร์รีน เป็น โปรตีนที่มีขนาดใหญ่ จึง เป็นแอนติเจนสำหรับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเฟอร์รีนในสัตว์ทดลองได้ เมื่อนำเฟอร์รีนที่เตรียมขึ้น และผ่านการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว มาฉีดเข้ากระต่ายทดลองตามวิธีทดลองในข้อ 3.8 หน้า 38 แล้วเจาะเลือดกระต่ายเพื่อหาไตเตอร์ของแอนติเฟอร์รีนที่เกิดขึ้น ตามวิธีทดลองในข้อ 3.9 หน้า 38

พบว่ากระต่ายทดลองสร้างแอนติบอดีต่อเฟอร์รีน (แอนติเฟอร์รีน) ขึ้น หลังจากการฉีดเฟอร์รีนครั้งที่ 2 ไปแล้ว 2 สัปดาห์ รูปแบบของแอนติเฟอร์รีนที่เกิดขึ้นในกระต่ายทดลองมีลักษณะใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 21

4.4 การศึกษาลากแอนติเฟอร์รีนด้วยโซเดียมไอโอไดค์ - 125

เมื่อคัดเลือกร่างแอนติเฟอร์รีนที่ได้จากกระต่ายทดลองด้วยอิมมิวโนแอสซอบเบนท์ และศึกษาลากด้วยสารรังสีโซเดียมไอโอไดค์ - 125 ตามวิธีในข้อ 3.10 หน้า 39 แล้วทำให้บริสุทธิ์ขึ้นตามวิธีในข้อ 3.10.3 หน้า 39 พบว่าไอโอไดคีน 125 ติดเข้าไปในส่วนที่เป็นโปรตีน (แอนติเฟอร์รีนและเฟอร์รีนในอิมมิวโนแอสซอบเบนท์) ในสารละลาย pH 3 2(1) 2(2) 2(3) และกระต่ายกรอง ประมาณ 5.5% 5.7% 1.3% 2.4% และ 0.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) เมื่อศึกษาคุณสมบัติของสารศึกษาลากแอนติเฟอร์รีนในการรวมตัวกับเฟอร์รีนอิมมิวโนแอสซอบเบนท์ ผลปรากฏว่าสารศึกษาลากแอนติเฟอร์รีนในสารละลายส่วนที่ 2 (1) จับกับเฟอร์รีนอิมมิวโนแอสซอบเบนท์ได้ดีกว่า 2 (2) (ตารางที่ 7) สำหรับสารละลายส่วนที่ 2 (3) มีปริมาณกัมมันตภาพรังสีไม่สูงพอที่จะนำมาใช้งานต่อไป

สารศึกษาลากแอนติเฟอร์รีนส่วนที่ 2 (1) และ 2 (2) ที่มีคุณสมบัติในการรวมตัวกับเฟอร์รีนจะเก็บอยู่ในรูปที่รวมตัวอยู่กับเฟอร์รีนอิมมิวโนแอสซอบเบนท์ โดยใช้อิมมิวโนแอสซอบเบนท์ใดตั้งแต่ 0.4 - 4 มิลลิกรัม (20 - 200 ไมโครลิตร) ซึ่งเป็นช่วงปริมาณอิมมิวโนแอสซอบเบนท์ที่ให้การจับสารศึกษาลากแอน



รูปที่ 21 ผลการฉีกร่างแอนติเฟอร์ิตินในกระต่ายทดลอง
เมื่อฉีดด้วยเฟอร์ิตินที่เตรียมได้จากตับของคน
(ลูกครแลดวงวันที่ของการฉีดกระตุ้น)

ตารางที่ 6 ผลการติดฉลากแอนติเฟอร์รีตินด้วยไฮโอติน 125

No. of experiment	% RADIOACTIVITY FOUND					
	pH 8	pH 3	pH 2(1)	pH 2(2)	pH 2(3)	filter paper
1	88.3	2.3	5.3	1.4	2.1	0.6
2	83.3	5.0	6.5	1.2	3.0	1.0
3	88.3	5.6	4.3	0.6	0.8	0.4
4	88.7	3.9	4.1	0.9	1.7	0.7
5	79.0	8.0	6.9	1.7	3.6	0.8
6	79.2	8.0	6.9	1.8	3.3	0.8
MEAN	84.5	5.5	5.7	1.3	2.4	0.7
±S.D.	4.61	2.26	1.28	0.46	1.07	0.20

ตารางที่ 7 ผลการดูดซับแอนติเฟอร์ริตินติดฉลากด้วยเฟอ
ริตินอิมมิวโนแอดลอปเบนท์

No of experiment	% ADSORBED OF ^{125}I ANTI-FERRITIN	
	pH 2(1)	pH 2(2)
1	31.6	23.1
2	62.9	44.0
3	46.2	37.6
4	63.7	40.7
5	45.4	33.5
6	47.4	33.3
MEAN \pm S.D.	49.5 \pm 12.11	35.4 \pm 7.30

คีเฟอร์ดินไม่แตกต่างกันมากนัก

4.5 การแยกสารสกัดจากแอนติเฟอร์ดินในรูปอิสระ

เนื่องจากสารสกัดจากแอนติเฟอร์ดินเก็บในรูปที่รวมตัวกับอิมมิวโนแอสบเบนท์ แต่สารสกัดจากแอนติเฟอร์ดินที่ใช้งานในการทดลองต่อไปต้องอยู่ในรูปอิสระ จึงแยกสารสกัดจากแอนติเฟอร์ดินออกจากอิมมิวโนแอสบเบนท์ตามวิธีในข้อ 3.10.5 หน้า 41 ใหญ่ลงในตารางที่ 8 และจากการทดสอบปฏิกิริยาการรวมตัวกับเฟอร์ดิน พบว่าสารสกัดจากแอนติเฟอร์ดินอิสระที่ใช้งานได้ก็คือส่วนที่แยกควยกรคไฮโดรคลอริก pH 2.5 และ pH 2.0 และความสามารถในการทำปฏิกิริยากับเฟอร์ดินของส่วนที่แยกควยกรคไฮโดรคลอริก pH 2.5 ก็กว่าส่วนที่แยกควยกรคไฮโดรคลอริก pH 2.0 (ตารางที่ 9) การวัดปริมาณเฟอร์ดินในซีรัมที่แสดงในรายงานนี้ จึงเลือกใช้สารสกัดจากแอนติเฟอร์ดินจากส่วนที่แยกควยกรคไฮโดรคลอริก pH 2.5

4.6 การหาสถานะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐานของเฟอร์ดิน

4.6.1 อิทธิพลของปริมาณเฟอร์ดินอิมมิวโนแอสบเบนท์ต่อการดูดซับสารสกัดจากแอนติเฟอร์ดินอิสระ

จากการศึกษาเฟอร์ดินอิมมิวโนแอสบเบนท์ที่เตรียมขึ้นใช้เอง พบว่าเฟอร์ดินอิมมิวโนแอสบเบนท์ที่เจือจาง 1 : 5 - 1 : 40 (0.5 - 4 มิลลิกรัม เซลลูโลส/มิลลิลิตร) สามารถดูดซับสารสกัดจากแอนติเฟอร์ดินได้ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 22) จึงเลือกเฟอร์ดินอิมมิวโนแอสบเบนท์ที่เจือจาง 1 : 40 เนื่องจากดูดซับได้ถึง 80 % และเป็นการประหยัด

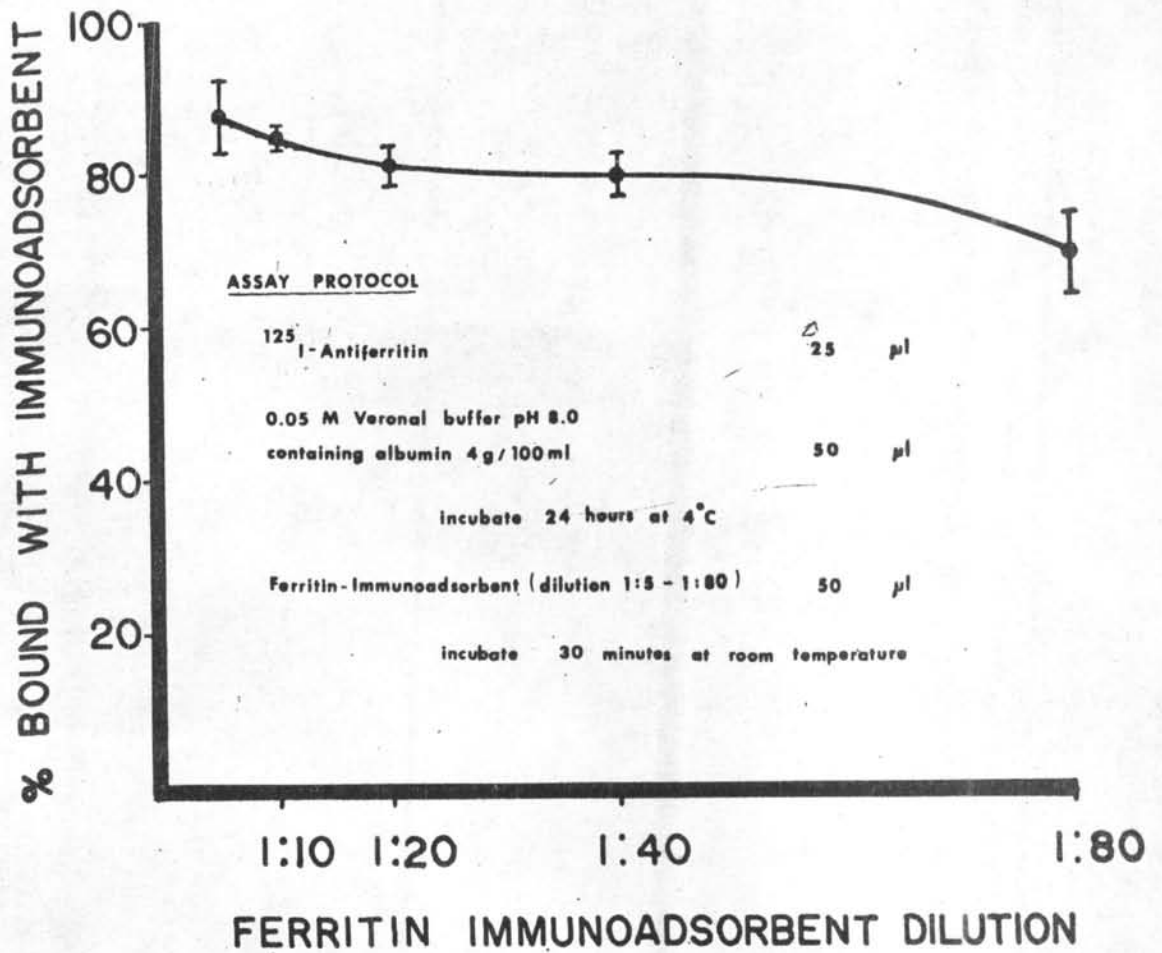
4.6.2 อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการดูดซับของเฟอร์ดินอิมมิวโนแอสบเบนท์

ตารางที่ 8 ผลการชะแอนติเฟอร์ริตินติดฉลากที่จุดจับติดอยู่กับอิมมิวโนแอดลอปเบนท์

No. of experiment	% ELUTION OF ANTIFERRITIN				
	pH8	pH 3	pH 2.5	pH 2	filter paper
1	54.8	13.4	14.3	8.8	8.7
2	63.2	5.5	10.9	7.6	12.9
3	59.0	7.2	12.0	6.0	15.8
4	62.9	4.4	8.2	7.2	17.3
5	59.7	4.7	10.5	7.9	17.2
6	36.5	10.9	14.0	12.0	26.6
7	33.7	11.4	16.1	13.0	25.8
8	38.3	9.2	16.4	12.0	24.1
9	39.4	9.2	13.8	11.1	26.5
10	38.7	6.2	13.6	11.7	29.8
11	38.3	5.9	17.0	9.0	29.8
12	40.8	6.4	12.1	9.6	31.1
13	24.2	16.8	18.3	13.0	27.7
14	25.8	18.7	16.2	12.8	26.5
MEAN	43.9	9.3	13.8	10.1	22.8
±S.D.	13.37	4.49	2.85	2.39	7.07

ตารางที่ 9 ความสามารถของสารติดฉลากแอนติเฟอร์ริติน --
ในการรวมตัวกับเฟอร์ริตินอิมมิวโนแอดซอร์บ --
เบนท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

FRACTION OF ANTIFERRITIN	% BOUND WITH IMMUNOADSORBENT				
		1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80
pH2.5	\bar{X}	84.8	80.9	80.0	69.0
	S.D.	1.4	2.8	2.9	5.1
	C.V.	1.6	3.6	3.7	7.5
	n	4	4	4	2
pH2.0	\bar{X}	64.9	62.2	61.2	25.0
	S.D.	11.8	9.4	9.9	1.8
	C.V.	18.2	15.1	16.2	7.2
	n	6	6	8	2



รูปที่ 22 ผลการดูดซับสารติดฉลากแอนติเฟอร์ริตินด้วย

อิมมิวโนแอดซอร์เบนท์

จากการศึกษาอิทธิพลของเวลา และอุณหภูมิต่อคุณสมบัติของเพอร์ิติน อิมมิวโนแอสซอบ เบนท์ในการคูดซับแอนติเพอร์ิตินอิสระที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยากับ เพอร์ิตินมาตรฐานพบว่า การคูดซับที่อุณหภูมิห้อง (26 - 28 องศาเซลเซียส) เกิดได้ดีกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป จึงใช้ปฏิกิริยาการคูดซับที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เนื่องจากเป็นสภาวะที่ให้ผลการคูดซับสูงพอ และความแตกต่างของการคูดซับระหว่างหลอดที่ไม่มี และมีเพอร์ิตินมาตรฐาน 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สูงกว่าสภาวะอื่น ๆ (รูปที่ 23)

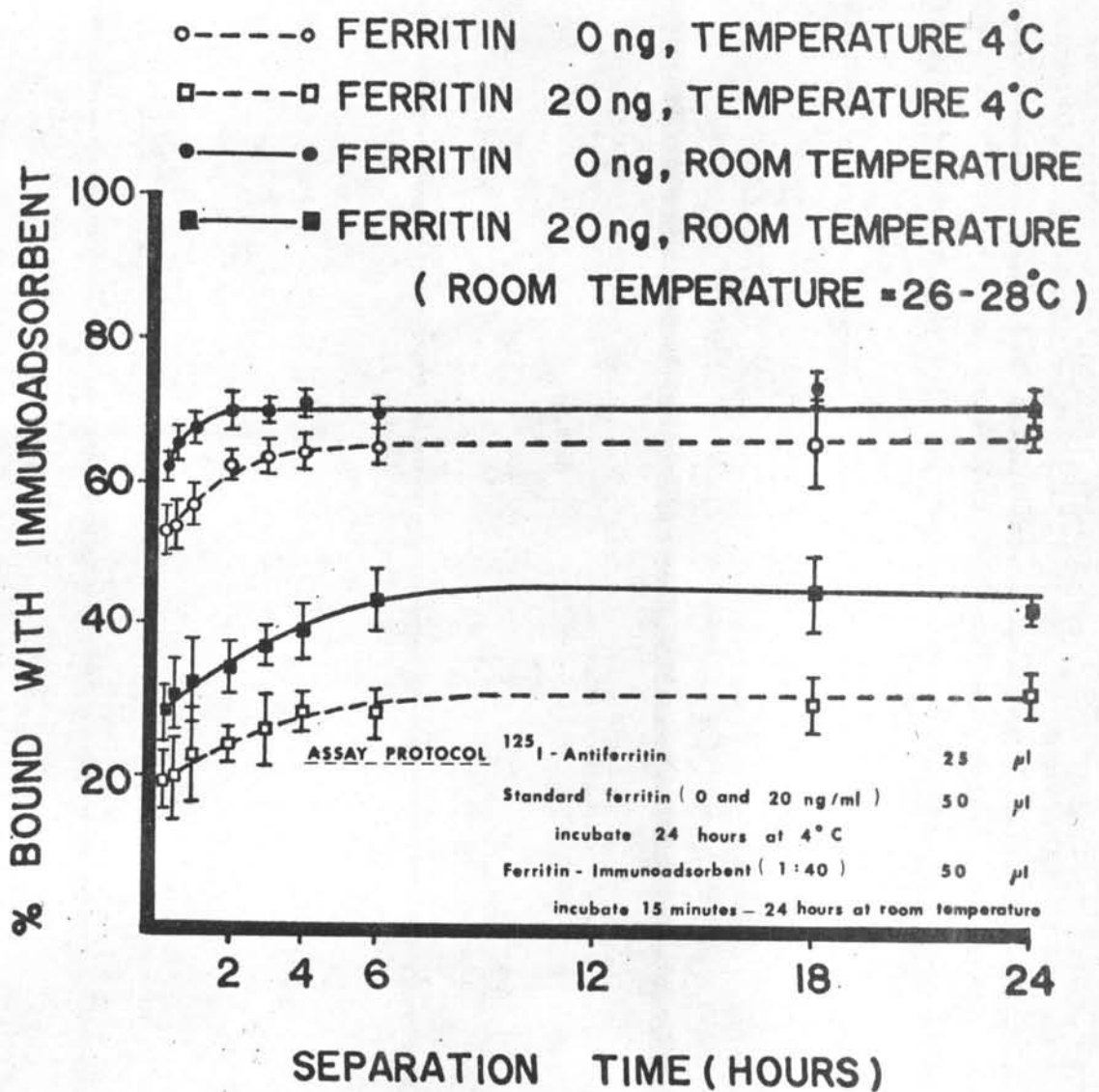
4.6.3 อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาการรวมตัวของเพอร์ิตินกับสารสกัดจากแอนติเพอร์ิติน

ผลการทดลองรูปที่ 24 แสดงว่า ปริมาณสารสกัดจากแอนติเพอร์ิตินอิสระจะลดลงเมื่อเวลาของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจาก 1 - 18 ชั่วโมง ทั้งที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียส ต่อจากนั้นปฏิกิริยาจะค่อนข้างคงที่ไปจนถึง 48 ชั่วโมง และเนื่องจากปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อไม่มีเพอร์ิตินอยู่ มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก จึงใช้เวลาในปฏิกิริยาการรวมตัวเป็น 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

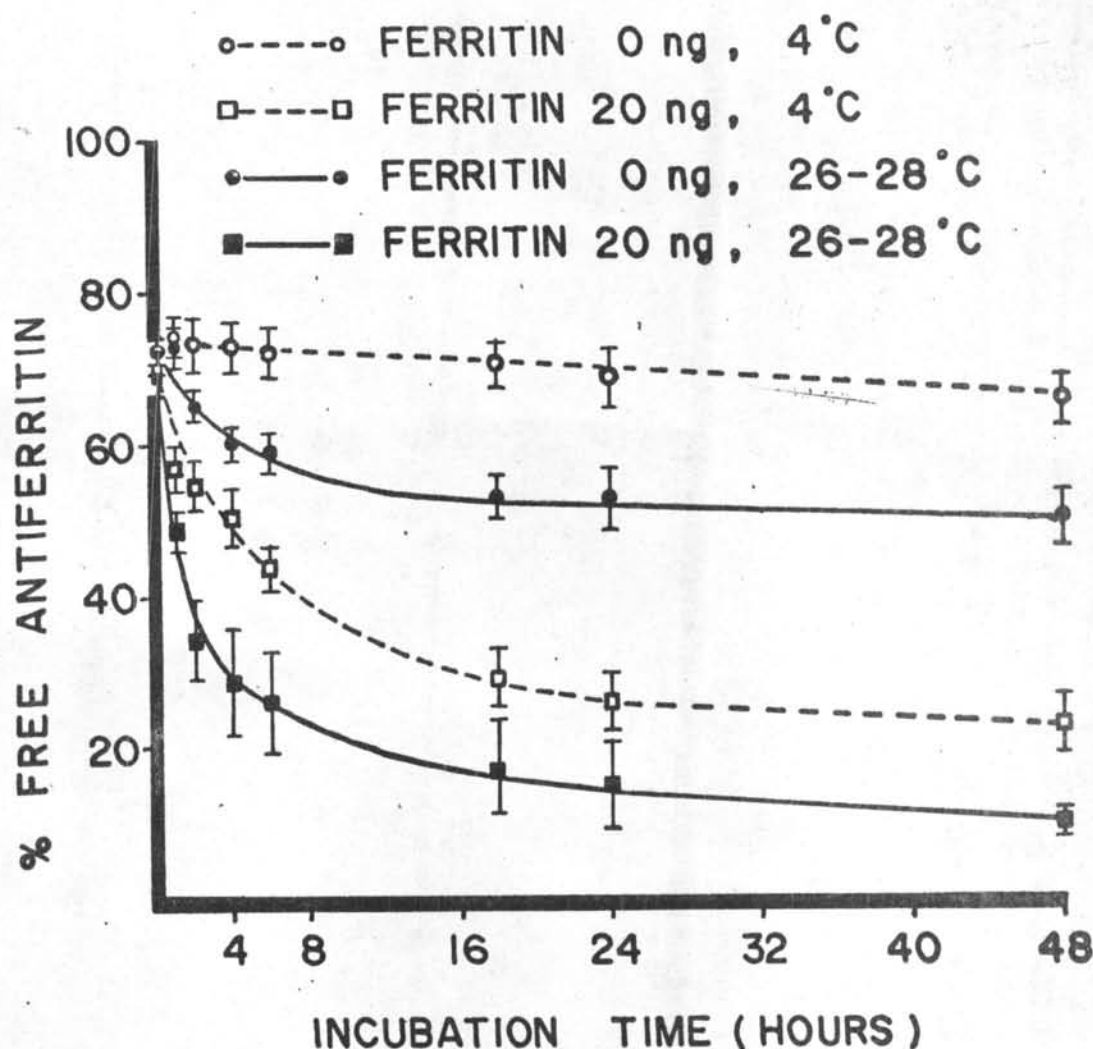
นำสภาวะเหมาะสมที่ศึกษาได้มาทดลองสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้เพอร์ิตินมาตรฐานตั้งแต่ 0.31 - 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากแอนติเพอร์ิตินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วเติมอิมมิวโนแอสซอบ เบนท์ (1 : 40) ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แยกสารละลายส่วนในสมานับกัมมันตภาพรังสี สร้างกราฟมาตรฐานจากผลที่ได้ จะปรากฏผลดังรูปที่ 25 หน้า 70

4.7 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณ

ได้ทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณทั้งในด้านความจำเพาะ ความไว ความแม่นยำ และความถูกต้อง จากผลการทดลองพบว่า แอนติเพอร์ิตินที่ใช้เกิดปฏิกิริยากับฮีโมโกลบิน และบิลิรูบิน น้อยกว่า 0.001 % ดังรูปที่ 26 ความ

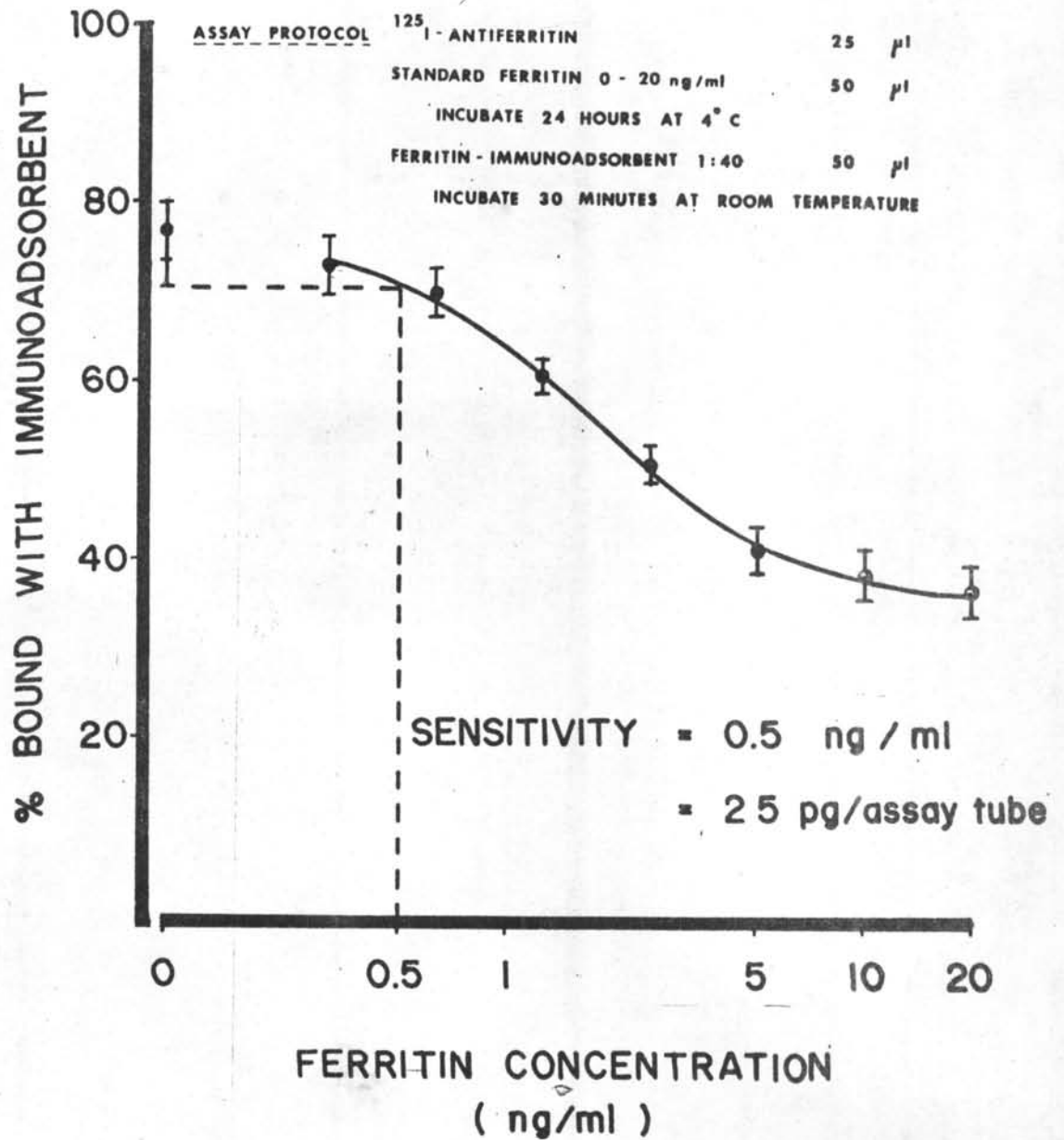


รูปที่ 23 อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการดูดซับแอนติเฟอร์ริตินอิสระโดยเฟอร์ริตินอิมมูโนแอดซอร์เบนต์

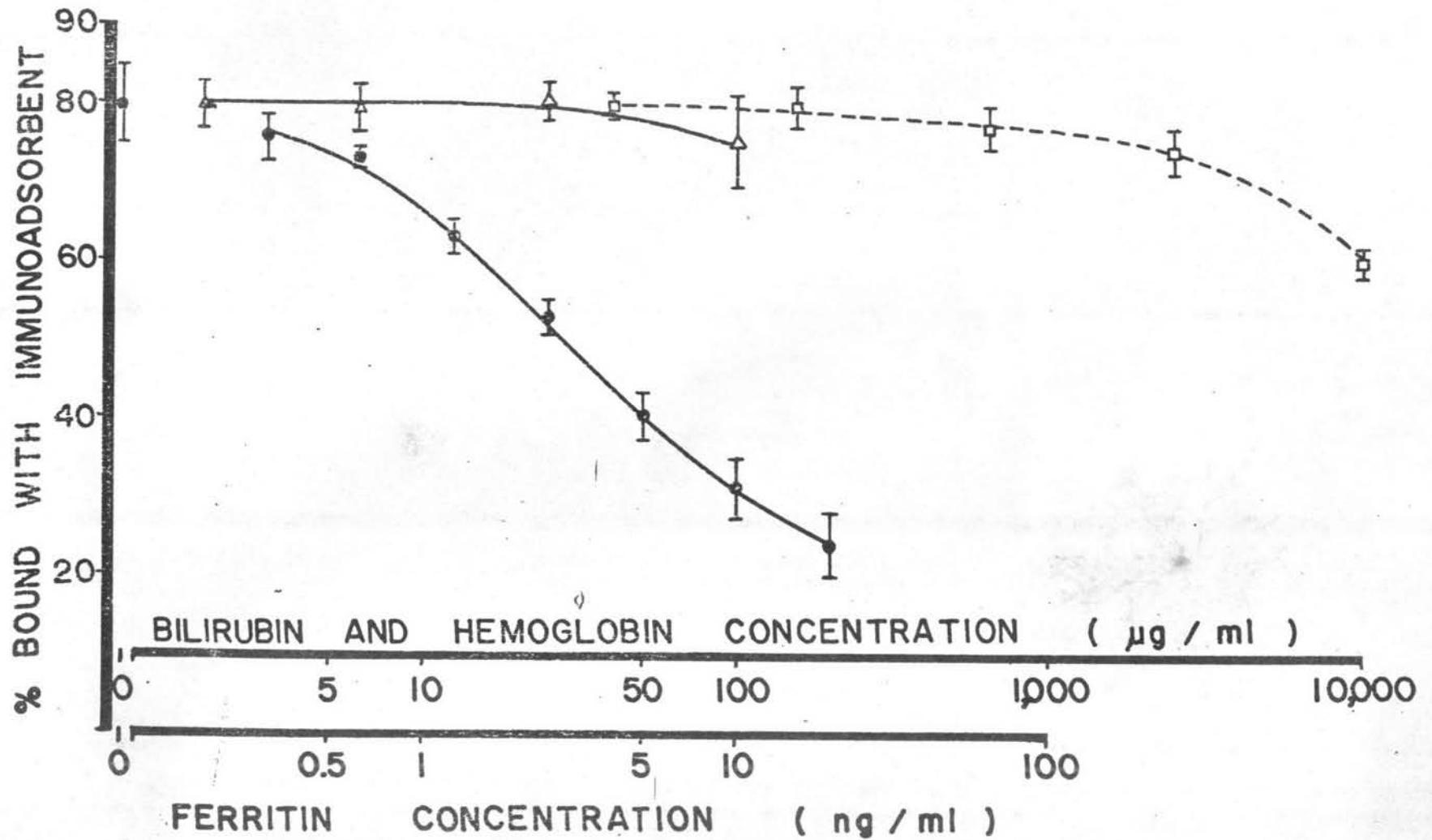


ASSAY PROTOCOL ^{125}I -Antiferritin 25 μl
 Standard ferritin (0 and 20 ng/ml) 50 μl
 incubate 1 - 48 hours at 4°C and 26 - 28°C
 Ferritin-immunoadsorbent (1:40) 50 μl
 incubate 30 minutes at room temperature

รูปที่ 24 อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อปฏิกิริยา
 การรวมตัวระหว่างแอนติเฟอร์ริตินกับเฟอ
 ริตินมาตรฐาน



รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณเฟอริติน
 โดยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอลเลย์



รูปที่ 26

กราฟมาตรฐานแสดงความจำเพาะของแอนติเฟอร์ริติน
 ●—● เฟอร์ริติน , ▲—▲ บิลิรูบิน , □—□ ฮีโมโกลบิน

ไวเจลีย์ของการวัดเป็น 0.3 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือ 16 พิโคกรัม/หลอด

ผลการทดสอบความแม่นยำ และความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณกึ่งตาราง ที่ 10 และ 11 ตามลำดับ แสดงว่าความแม่นยำ อยู่ในระดับที่น่าพอใจ ทั้งในการวัดภายในการทดลองเดียวกัน (within assay) และการวัดระหว่างการทดลอง (between assay) ทั้งในตัวอย่างที่มีระดับเฟอริตินปกติ และสูงกว่าปกติ ความถูกต้องของวิธีวัดอยู่ระหว่าง 94.9 - 99.8 %

4.8 ผลการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัม

4.8.1 ตัวอย่างซีรัมปกติ

ผลการหาปริมาณเฟอริตินในซีรัมของหญิงไทย 50 ราย และชายไทย 25 ราย ที่มีสุขภาพสมบูรณ์ ระดับฮีโมโกลบินและกลูตาเมทออกซาโลอะซีเตททรานสอามิเนส (SGOT) ปกติ พบว่าค่าเฟอริตินอยู่ระหว่าง 10 - 200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยที่ปริมาณเฟอริตินในชายไทยมีค่าสูงกว่าหญิงไทยเล็กน้อย ดังรูปที่ 28 ค่าเฉลี่ยเลขคณิตและเรขาคณิตในชายไทยเป็น 84 และ 71 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนหญิงไทยเป็น 65 และ 52 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

4.8.2 ตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วย

ปริมาณเฟอริตินในซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียชนิด β^0/α 16 ราย และอัลฟา-ธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบิน H 12 ราย พบค่าเฉลี่ยเลขคณิต 1352 และ 275 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต 959 และ 207 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)

เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับผลที่วัดโดยสารละลายสำเร็จรูป พบว่า ทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังตารางที่ 12 หน้า 77

ตารางที่ 10 ความแม่นยำของการวัดปริมาณเฟอริตินโดย
วิธีอิมมูโนเรดิโอเมตริกแอดเลย์

	POOL A **		POOL B ***	
	WITHIN ASSAY	BETWEEN ASSAY	WITHIN ASSAY	BETWEEN ASSAY
MEAN (ng/ml)	103	99.4	2989	3098
S.D. (ng/ml)	8	7.6	277	252
C.V. (%)	7.7	7.7	9.3	8.1
n*	40	10	40	10

* ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง

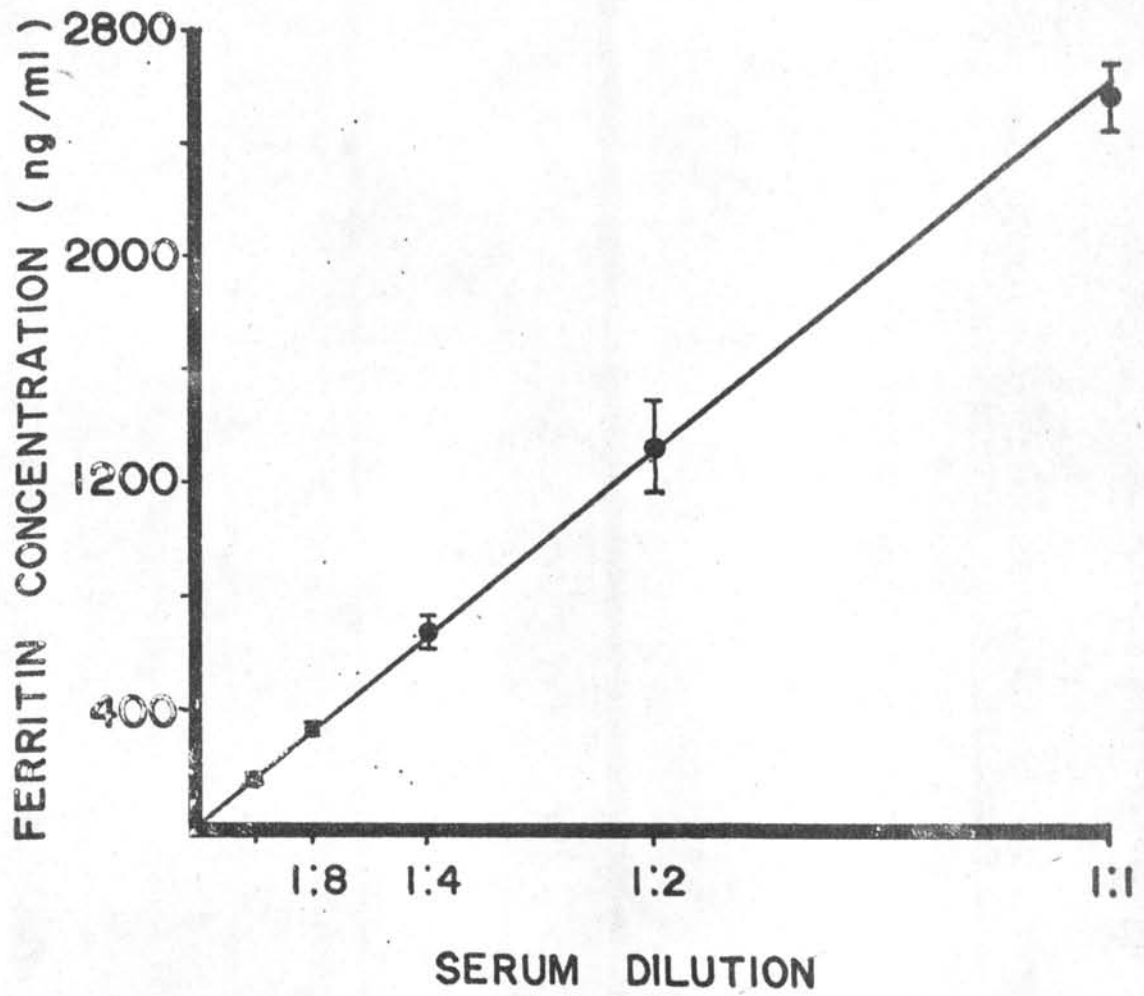
** ซีรัมที่มีระดับเฟอริตินปกติ

*** ซีรัมที่มีระดับเฟอริตินสูง

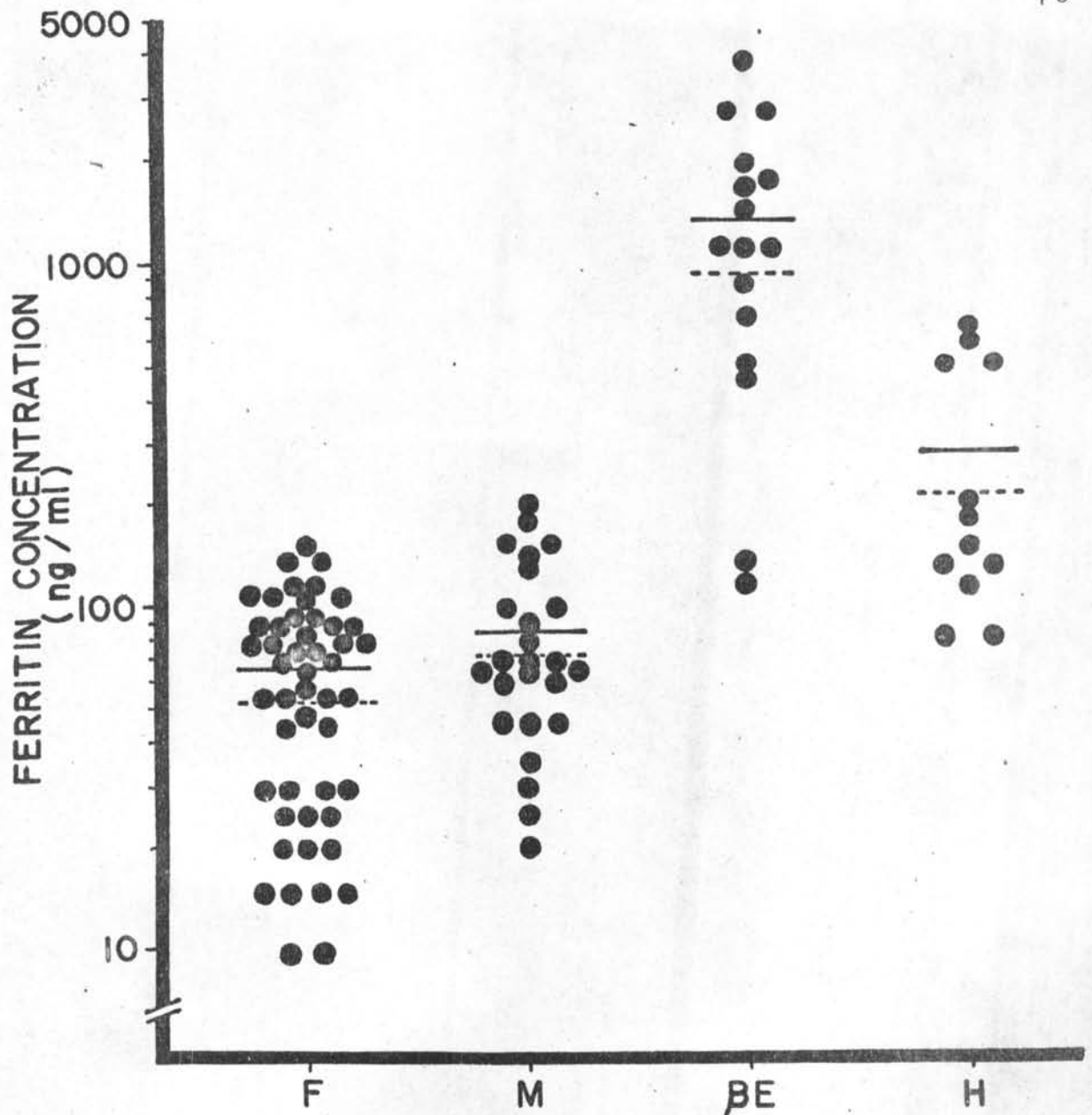
ตารางที่ 11 ความถูกต้องของการวัดปริมาณเฟอริตินโดย
วิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอลเลย์

FERRITIN ADD (ng/ml)	% RECOVERY				
		I*	II*	III*	TOTAL
1.25	\bar{X}	115	98	86	99.7
	S.D.	3.8	10.1	6.5	14.1
	C.V.	3.3	10.3	7.6	14.1
2.5	\bar{X}	102	96	96	98
	S.D.	9.8	9.2	8.2	8.7
	C.V.	9.6	9.6	8.5	8.9
5	\bar{X}	100	101	98.5	99.8
	S.D.	4.6	13.6	3.0	7.7
	C.V.	4.6	13.4	3.0	7.7
10	\bar{X}	93	100	91.8	94.9
	S.D.	11.6	12.0	8.5	10.4
	C.V.	12.5	12.0	9.2	11.0

* ทำการทดลองชุดละ 5 ตัวอย่าง ละ 3 ครั้ง



รูปที่ 27 ผลการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมที่มี -
ความเจือจางในระดับต่างๆ

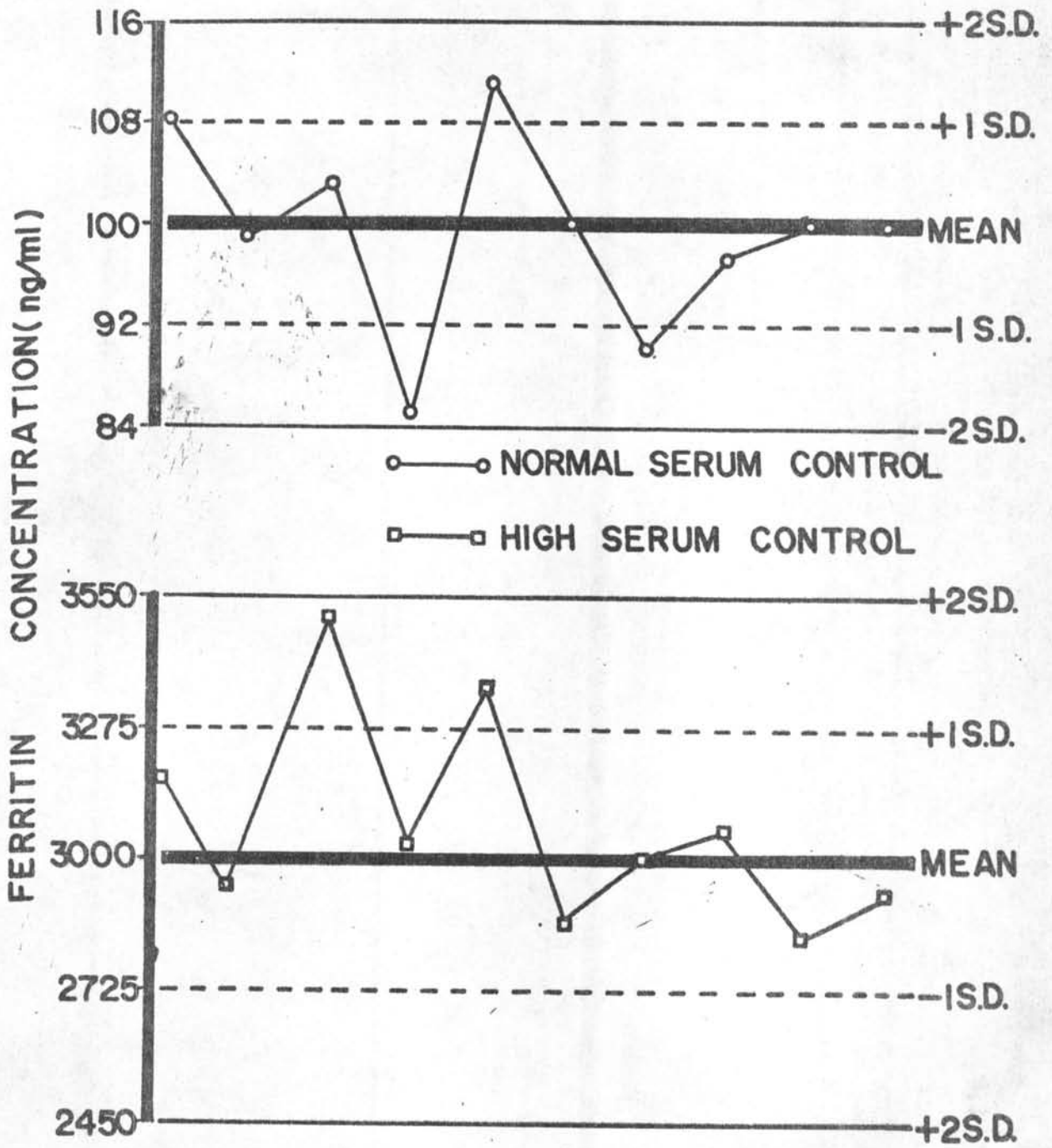


รูปที่ 28 การกระจายตัวของปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคนปกติและคนที่เป็โรคธาลาซีเมีย
 — ค่าเฉลี่ยเลขคณิต ---- ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต
 F - หญิงปกติ M - ชายปกติ BE และ H - โรคธาลาซีเมียชนิด β/E และชนิดฮีโมโกลบิน H

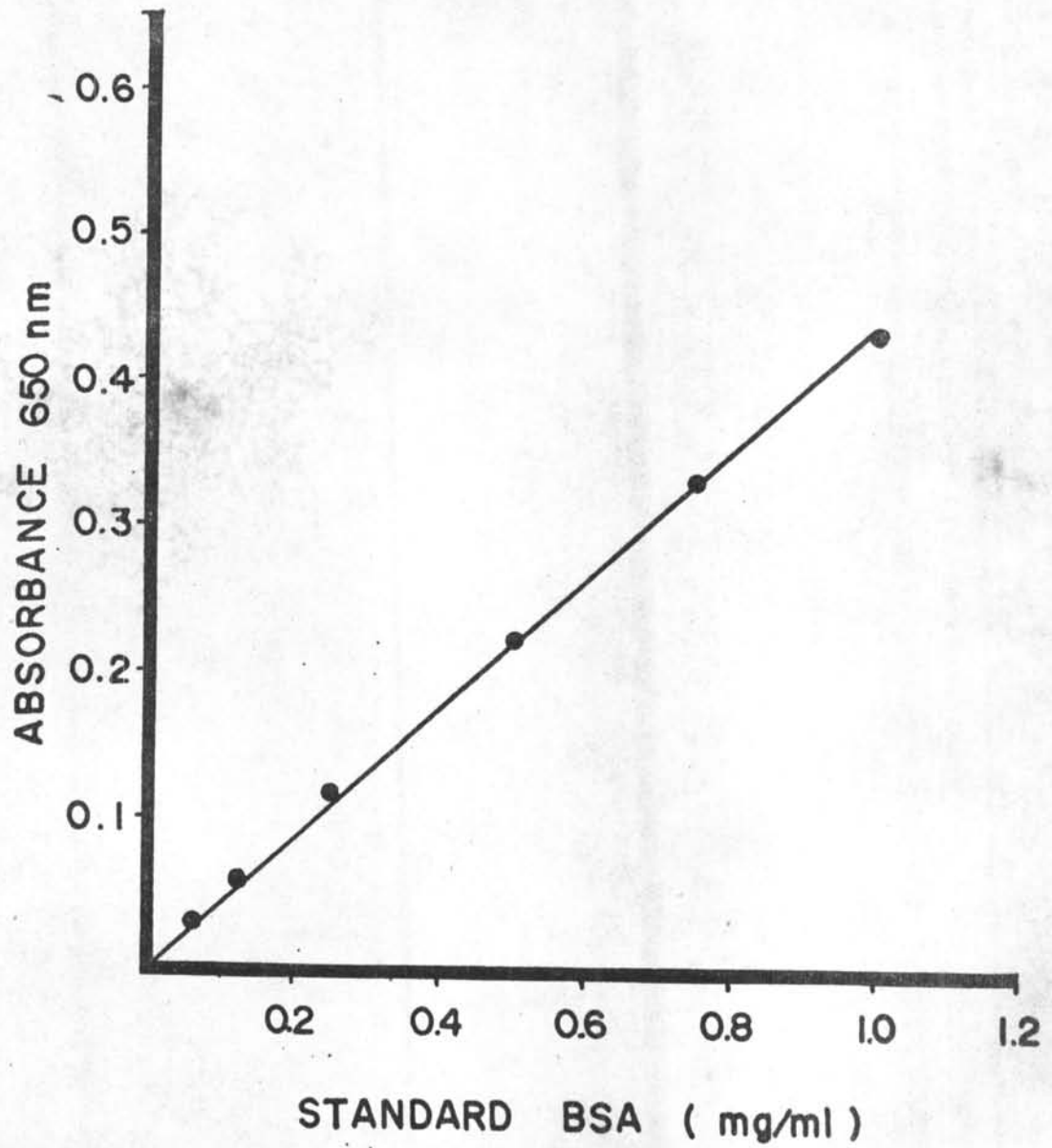
ตารางที่ 12 ผลเปรียบเทียบการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมด้วยสารละลายที่เตรียมขึ้นใช้เองและสารละลายสำเร็จรูป

No. of samples	Ferritin Concentration (ng / ml)	
	Locally Prepared Reagent	Commercially Reagent (RAMCO KITS)
1	1080	960
2	500	500
3	1720	2000
4	116	132
5	840	880
6	2700	2400
7	3700	3680
8	1880	1560
9	1120	1080
10	1360	1240
11	100	96
12	200	250
13	80	80
14	180	130
15	500	500
16	640	600
17	116	112
18	148	164
19	500	480
20	600	640

insignificantly different (95 % confident limit)



รูปที่ 29 แผนภาพแสดงตัวอย่างการควบคุมคุณภาพของ
การวัดปริมาณเฟอร์ริติน



รูปที่ 30 **เส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน**
BSA โดยวิธีของ LOWRY