การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคนโดยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายจำรัส ทรัพย์สมานวงศ์

000359

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2523

Determination of Ferritin in Human Serum by Immunoradiometric Assay

Mr. Chumras Sapsamarnwong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1980

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคนโดยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์
โดย	นายจำรัส ทรัพย์สมานวงศ์
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราพรรณ ด่านอุตรา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ รัตนาภรณ์ เกษมสุทธิ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ไชศรี อาภรณ์รัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ.ญ. เพ็ญศรี ภู่ตระกูล)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปรีดา ชัยศิริ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ รัตนาภรณ์ เกษมสุทธิ์)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคนโดยวิธีอิมมิวโน เรดิโอเมตริกแอสเสย์
ชื่อนิสิต	นายจารัส ทรัพย์สมานวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราพรรณ ด่านอุตรา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ รัตนาภรณ์ เกษมสุทธิ์
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2522

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคนด้วยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ในรายงานนี้ เสนอผลการพัฒนาวิธีการวัดปริมาณเฟอริตินโดยอาศัยปฏิกริยาของเฟอริตินและสารรังสีคือแอนติเฟอริตินที่ติดฉลากด้วยไอโอดีน – 125 แอนติเฟอริตินที่ได้เตรียมมาจากการฉีดเฟอริตินที่เตรียมมาจากตับคนเข้าในกระต่ายทดลอง

จากการศึกษาหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกริยาอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ของเฟอริตินพบว่า เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกริยาระหว่างสารติดฉลากแอนติเฟอริตินและเฟอริตินคือ 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส การแยกสารติดฉลากแอนติเฟอริตินอิสระออกจากรูปที่รวมตัวกับเฟอริตินใช้เฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ (เจือจาง 1 : 40) หลอดละ 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (26 – 28 องศาเซลเซียส) 30 นาที

ความเชื่อถือได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้อยู่ในระดับสูง กล่าวคือแอนติซีรัมที่เตรียมได้ไม่เกิดปฏิกริยากับธีโมโกลบินและบิลิรูบิน ความไวเฉลี่ย 0.3 นาโนกรัม / มิลลิลิตร หรือ 16 พิโคกรัม / หลอดทดลอง สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 7.7 – 9.3 % และ 7.7 – 8.1 %ในการทดลองเดียวกันและระหว่างการทดลองตามลำดับ ความถูกต้องของวิธีทดลองอยู่ระหว่าง

94.9 – 99.8 % เมื่อเติมเฟอริติน 1.25 – 10 นาโนกรัม / มิลลิลิตร

ผลการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมของหญิงไทยปกติ 50 ราย และชายไทยปกติ 25 ราย พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 10 – 200 นาโนกรัม / มิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยเรขาคณิตเท่ากับ 52 และ 71 นาโนกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเรขาคณิตของปริมาณเฟอริตินในซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลาสซีเมียชนิด B/E 16 ราย เป็น 959 นาโนกรัม / มิลลิลิตร ส่วนค่าเฉลี่ยเรขาคณิตที่พบในผู้ป่วยโรคอัลฟา – ธาลาสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินH 12 ราย สูงกว่าค่าปกติเล็กน้อยคือ 207 นาโนกรัม / มิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบผลการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมตัวอย่าง 20ตัวอย่าง โดยวิธีใช้สารที่เตรียมขึ้นเองกับสารสำเร็จรูปที่ซื้อจากต่างประเทศ พบว่าผลการทดลองไม่แตกต่างกัน

Thesis Title	Determination of Ferritin in Human Serum by Immunoradiometric Assay.
Name	Mr. Chumras Sapsamarnwong
Thesis Advisor	Assistant Professor Varapan Danutra, Ph.D.
Thesis Co - Advisor	Miss Ratanaporn Kasemsuth
Department	Biochemistry
Academic Year	1979

Abstract

An immunoradiometric assay for the human serum ferritin is described . The assay utilized the antiserum produced in rabbit against human liver ferritin . The ^{125}I - labelled anti - human ferritin was prepared by the choramine - T method. The incubation was performed at 4° C for 24 hours , and the separation of free and bound forms of labelled anti - human ferritin was accomplished by the addition of 50 µl ferritin - immunoadsorbent (dilution 1 : 40) at room temperature (26 - 28 °C) for 30 minutes.

The reliability of the method was considered highly satisfactory . The antiserum obtained showed insignificant cross reaction with haemoglobin and bilirubin . The average sensitivity was found to be 0.3 ng / ml or 16 pg / tube. The coefficient of variation varied from 7.7 - 9.3 % and 7.7 - 8.1 % for within and between assays respectively. An accuracy between 94.9 - 99.8 % were obtained when 1.25 - 10 ng / ml of ferritin were added into

control serum

The range of serum ferritin in 50 normal Thai females and 25 males was found to be 10 - 200 ng/ml with the geometric means of 52 and 71 ng/ml respectively. Patients with haemoglobin H showed slighly higher level (207 ng/ml) whereas 959 ng/ml was found in the β thalassemia/haemoglobin E group.

Twenty samples were used in a comparative study of the serum ferritin assay using locally prepared and commercially available reagents . The results obtained were found to be insignificantly different .

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ และขอขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราพรรณ	ดำนอุตรา
ศาสตราจารย์ ไขศรี	อาภรณ์รัตน์
ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สวณัฐ	ชาระวณิช
รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิชัย	โปษยะจินดา
รองศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ	ชัยคำภา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง เพ็ญศรี	ภู่ตระกูล
อาจารย์ ดร. ปรีดา	ชัยสิริ
อาจารย์ รัตนาภรณ์	เกษมสุทธิ์
อาจารย์ สัตวแพทย์ ชาญณรงค์	แสงหิรัญ
คุณรัตนา	เจนเจริญธรรม
คุณฐิติพร	สุระพิศิษฐชาติ
คุณวิไล	ชีณเวชกิจวานิชย์

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แผนกนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ภาควิชารังสีไอโซโทปเชตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ขอขอบคุณ Dr. M. Worwood แห่ง Welsh National School of Medicine Cardiff , U.K. และ Dr. H.G. Van Eijk แห่ง Department of Chemical Pathology , Medical Faculty , Eramus University , Rotterdam ,Nather land. ที่ได้กรุณาให้สารต่าง ๆ ที่จำเป็นในการทดลอง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย และสภาวิจัยแห่งชาติที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

.....

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ฆ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ช
สารบัญ ..... ฌ
รายการตารางประกอบ ..... ฎ
รายการรูปประกอบ ..... ฏ
คำย่อ ..... ฑ
บทที่
1 บทนำ 1
2 เคมีภัณฑ์ วัสดุภัณฑ์ และเครื่องมือ
2.1 เคมีภัณฑ์ 17
2.2 วัสดุภัณฑ์ 18
2.3 เครื่องมือ 19
2.4 สัตว์ทดลอง 20
2.5 การเก็บเนื้อเยื่อและซีรัมตัวอย่าง 20
3 วิธีทดลอง
3.1 การเตรียมสารละลาย 22
3.2 การเตรียมคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน 29
3.3 การเตรียมเฟอริตินจากตับของคน 30
3.4 การตรวจสอบตำแหน่งของเฟอริตินจากสารละลายที่เก็บได้จากคอลัมน์เซฟาโรส 6 B 33
3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเฟอริติน 34
3.6 การวัดปริมาณโปรตีน 35

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

หน้า

3.7 วิธีเตรียมอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ 36
3.8 วิธีเตรียมแอนติเฟอริตินในกระต่ายทดลอง 38
3.9 วิธีหาไตเตอร์ของแอนติเฟอริติน 38
3.10วิธีตกตะกอนแอนติเฟอร์ติน 39
3.11การทดสอบปฏิกริยาทางอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ .. 42
3.12วิธีวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัม 43
3.13การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณ 44
4 ผลการทดลอง
4.1 ผลการเตรียมเฟอริตินจากตับของคน 46
4.2 ผลการเตรียมอิมมิวโนแอดสอบเบนท์ 57
4.3 ผลการผลิตแอนติเฟอริตินในกระต่ายทดลอง 59
4.4 ผลการตกตะกอนแอนติเฟอริตินด้วยโซเดียมไอโอไดด์–125 59
4.5 ผลการแยกสารตกตะกอนแอนติเฟอริตินให้อยู่ในรูปอิสระ .. 63
4.6 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเส้นกราฟ
มาตรฐานของเฟอริติน 63
4.7 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณเฟอริติน .. 67
4.8 ผลการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัม 72
5 วิจารณ์ผลการทดลอง 80
เอกสารอ้างอิง 89
ประวัติผู้เขียน 98

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	การกระจายของเหล็กในร่างกายของคน	1
2	ขั้นตอนการชะล้างสารติดฉลากแอนติเฟอริตินด้วยสารละลายต่างๆ	40
3	ขั้นตอนการชะล้างสารติดฉลากแอนติเฟอริตินให้อยู่ในรูปอิสระ	41
4	รายละเอียดการทำอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์	42
5	การวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมด้วยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์	43
6	ผลการติดฉลากแอนติเฟอริตินด้วยไอโอดีน – 125	61
7	ผลการดูดซับแอนติเฟอริตินติดฉลากด้วยเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์	62
8	ผลการชะแอนติเฟอริตินติดฉลากที่ดูดซับติดอยู่กับอิมมิวโนแอดสอบเบนท์	64
9	ความสามารถของสารติดฉลากแอนติเฟอริตินในการรวมตัวกับเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์	65
10	ความแม่นยำของการวัดปริมาณเฟอริตินโดยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์	73
11	ความถูกต้องของการวัดปริมาณเฟอริตินโดยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์	74
12	ผลเปรียบเทียบการวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมด้วยสารละลายที่เตรียมขึ้นใช้เองและสารละลายสำเร็จรูป	77

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	การจัดตัวของโมเลกุลเฟอริติน	2
2	โครงสร้างอะตอมของสารเชิงซ้อนของเหล็กที่อยู่ในเฟอริติน	3
3	ภาพเขียนแสดงการกระจายตัวของเหล็กในโมเลกุลของเฟอริติน	3
4	การแลกเปลี่ยนและเคลื่อนย้ายเหล็กภายในร่างกายของคน	5
5	ระดับความรุนแรงของการขาดเหล็กและขอบงชี้ที่ใช้แยกระดับความรุนแรง	8
6	การสกัดแยกเฟอริตินจากเนื้อเยื่อโดยวิธีต่าง ๆ	11
7	หลักการติดฉลากและวิธีวัดปริมาณเฟอริตินในซีรัมโดยวิธีอิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์	13
8	ขั้นตอนการเตรียมเฟอริตินจากตับของคน	31
9	ตำแหน่งการเจาะหลุมบนแผ่นอะการ์โรสสำหรับทำอิมมิวโนดิฟฟิวส์ชัน	34
10	ขั้นตอนการเตรียมเฟอริตินและทดสอบความบริสุทธิ์	47
11	รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50 % แยกโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส	48
12	รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากการปั่นสารละลายด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100,000 ɡ แยกโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส	49
13	ผลการแยกโปรตีนในสารละลายที่ได้จากการปั่นด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100,000 ɡ โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G 200	50
14	รูปแบบของโปรตีนในสารละลายส่วนที่ 1 ที่เก็บได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ ɡ 200 โดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส	51
15	ผลการแยกโปรตีนในสารละลายที่ได้จากการปั่นด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100,000 ɡ โดยคอลัมน์เซฟาโรส 6 B	52
16	อิมมิวโนดิฟฟิวส์ชันเจลแสดงตำแหน่งเฟอริตินที่เก็บได้จากคอลัมน์เซฟาโรส 6 B	53

รูปที่ หน้า

17 รูปแบบของโปรตีนในสารละลายส่วนที่ 3 ที่เก็บได้จาก
คอลัมน์เซฟาโรส 6B แยกโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส. 54
18 ผลการแยกโปรตีนในสารละลายส่วนที่ 1 ที่ได้จากคอลัมน์
เซฟาเด็กซ์ G 200 โดยใช้คอลัมน์เซฟาโรส 6B..... 55
19 รูปแบบของโปรตีนในสารละลายส่วนที่ 1 ที่เก็บได้จาก
คอลัมน์เซฟาโรส 6B แยกโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟรีซีส. 56
20 ความสามารถของเฟอริตินในการเชื่อมต่อกับโมเลกุลของ
ไดเอโซเซลลูโลส..... 58
21 ผลการสร้างแอนติเฟอริตินในกระต่ายทดลองเมื่อฉีดด้วยเฟอริติน
ที่เตรียมได้จากตับของคน..... 60
22 ผลการดูดซับสารติดฉลากแอนติเฟอริตินด้วยอิมมิวโนแอดสอบเบนท์..... 66
23 อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการดูดซับแอนติเฟอริตินอิสระ
โดยเฟอริตินอิมมิวโนแอดสอบเบนท์..... 68
24 อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อปฏิกริยาการรวมตัวระหว่าง
แอนติเฟอริตินกับเฟอริตินมาตรฐาน..... 69
25 กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณเฟอริตินโดยวิธี
อิมมิวโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์..... 70
26 กราฟมาตรฐานแสดงความจำเพาะของแอนติเฟอริติน..... 71
27 ผลการวัดปริมาณเฟอริตินที่มีความเจือจางระดับต่าง ๆ..... 75
28 การกระจายตัวของปริมาณเฟอริตินในซีรัมของคนปกติ
และที่เป็นโรคธาลาสซีเมีย..... 76
29 ตัวอย่างการควบคุมคุณภาพของผลการวัดปริมาณเฟอริติน..... 78
30 เส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธีของ Lowry
และคณะ..... 79

คำย่อ

BIS	=	N , N' - Methylenediacrylamide
BSA	=	Bovine serum albumin
CNBr	=	Cyanogen bromide
cpm	=	count per minute
C.V.	=	Coefficient of variation
Fe	=	Iron
G	=	Gravity
Hb	=	Haemoglobin
I	=	Iodine
IRMA	=	Immunoradiometric Assay
M	=	Molar
MCH	=	Mean corpuscular haemoglobin
MCHC	=	Mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	=	Mean corpuscular volume
ml	=	millilitre
mm^3	=	cubic millimetre
µg	=	microgram
ng	=	nanogram
pg	=	picogram
RIA	=	Radioimmunoassay
S.D.	=	Standard deviation
TEMED	=	N, N, N', N' - Tetramethylethylenodiamine
$\bar{X}$	=	Meam