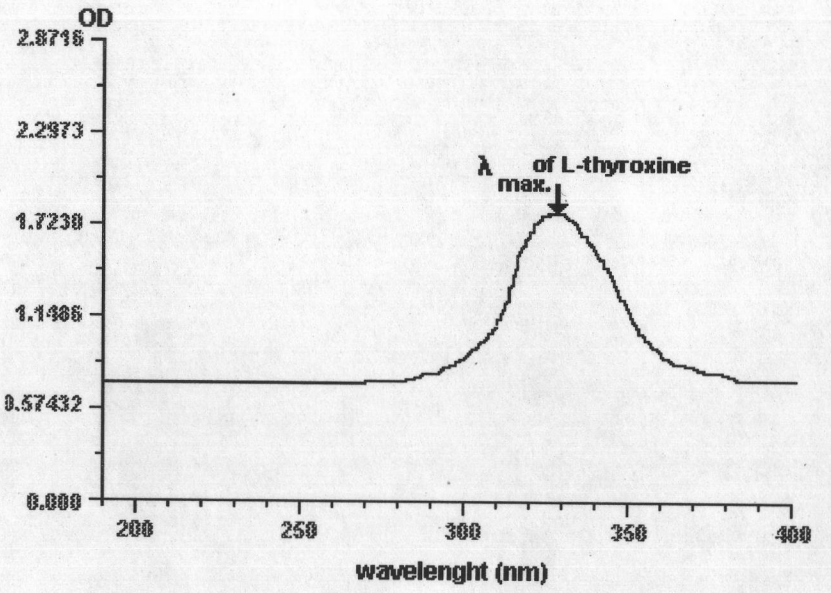
บทที่ 3

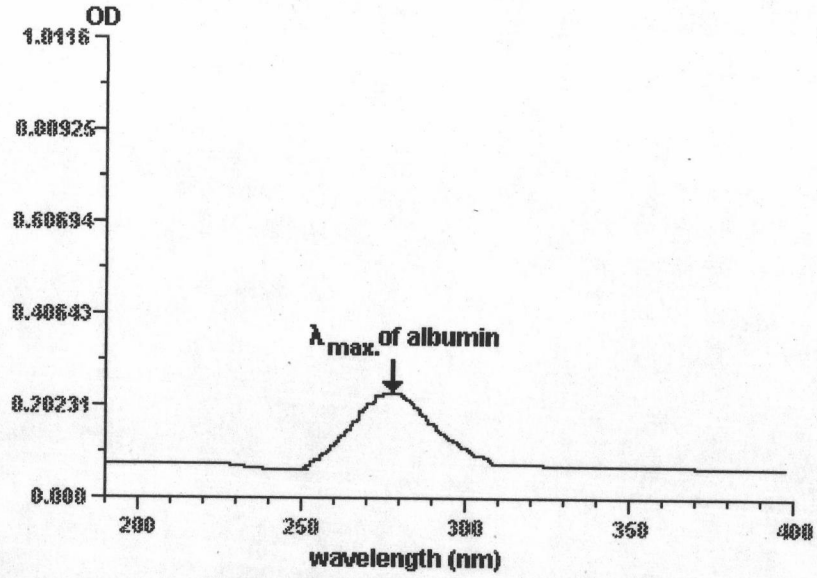
ผลการวิจัย

3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ธัยรอกซิน-โปรตีน คอนจูเกต โดยวิธียูวีสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV spectrophotometry)

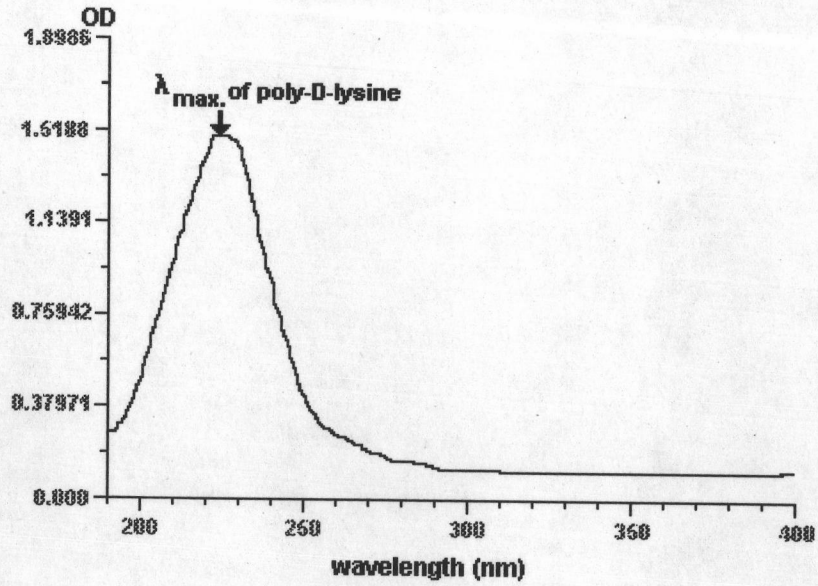
ในการเตรียมธัยรอกซิน-โปรตีน คอนจูเกต เมื่อนำสารตั้งต้นมาตรวจสอบคุณภาพโดยนำไปวัดความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนสูงสุดด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าในช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร ธัยรอกซินให้ค่าการดูดกลืนสูงสุดที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร (รูปที่ 10) อัลบูมิน (ทั้งโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน และ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน) ให้ค่าการดูดกลืนสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (รูปที่ 11) ส่วนโพลี-ดี-ไลซีนให้ค่าการดูดกลืนสูงสุดที่ความยาวคลื่น 222 นาโนเมตร (รูปที่ 12)



รูปที่ 10 แสดงยูวีสเปกตรัมของแอล-ธัยรอกซินในช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตรซึ่งให้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ 326 นาโนเมตร



รูปที่ 11 แสดงยูวีสเปกตรัมของโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน และ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินในช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร ซึ่งให้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ 280 นาโนเมตร



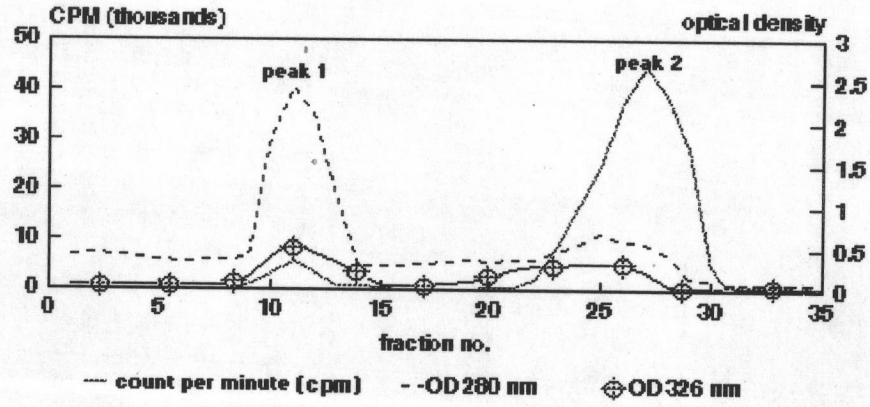
รูปที่ 12 แสดงยูวีสเปกตรัมของโพลี-ดี-ไลซีน ในช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร ซึ่งให้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ 222 นาโนเมตร

I 15285582

3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ธัยรอกซิน-โปรตีน คอนจูเกตที่เตรียมได้

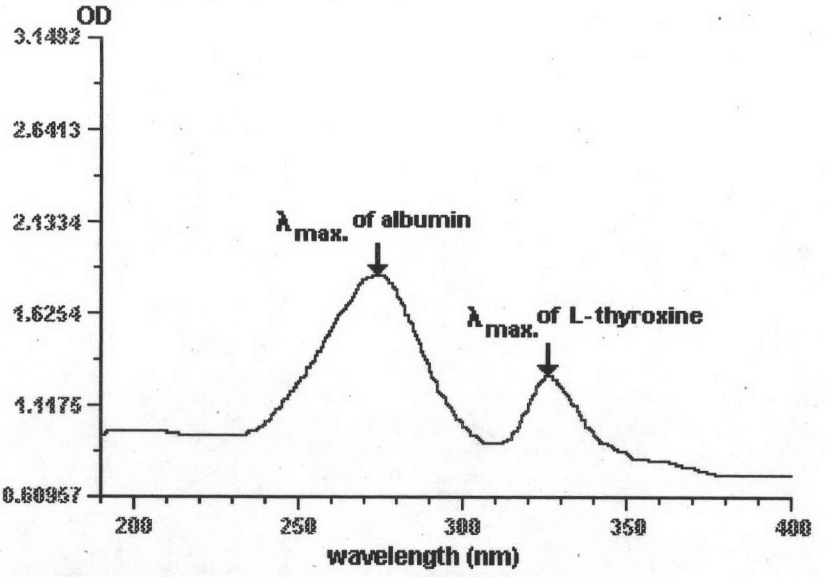
3.2.1 <u>ธัยรอกซิน-อัลบูมิน คอนจูเกต (ทั้งโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน และ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน)</u>

เมื่อผ่านขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) แล้วนำแต่ละหลอด (tube) ที่เก็บได้ไปวัดค่าอัตรานับวัดด้วยเครื่องนับจำนวนรังสีแกมมา (Gamma counter) เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสารเริ่มต้นทั้ง 2 ตัว แสดงได้ดังรูปที่ 13



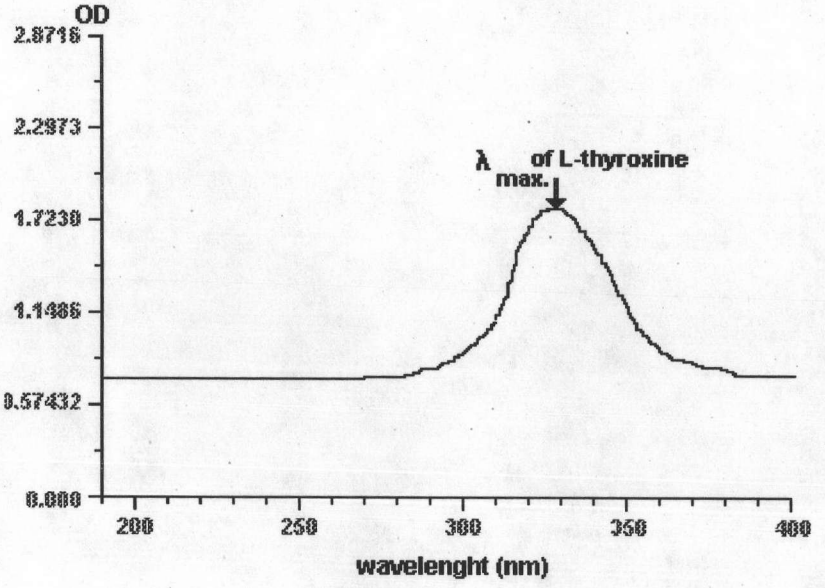
รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบพีคการแยกจากค่าอัตรานับวัด และ ค่าการดูดกลืนที่ 2 ความยาวคลื่นในแต่ละหลอดของการแยกธัยรอกซิน-อัลบูมิน คอนจูเกต

จากรูปที่ 13 พีคแรกเป็นพีคของสารที่สนใจซึ่งคือธัยรอกซิน-อัลบูมิน คอนจูเกต โดยสอดคล้องกันทั้งค่าอัตรานับวัดและค่าการดูดกลืนทั้ง 2 ความยาวคลื่น แสดงได้ดังยูวีสเปกตรัมรูปที่ 14 ซึ่งปรากฏพีคที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสารเริ่มต้นทั้ง 2 ตัว คือ ธัยรอกซิน และ อัลบูมิน

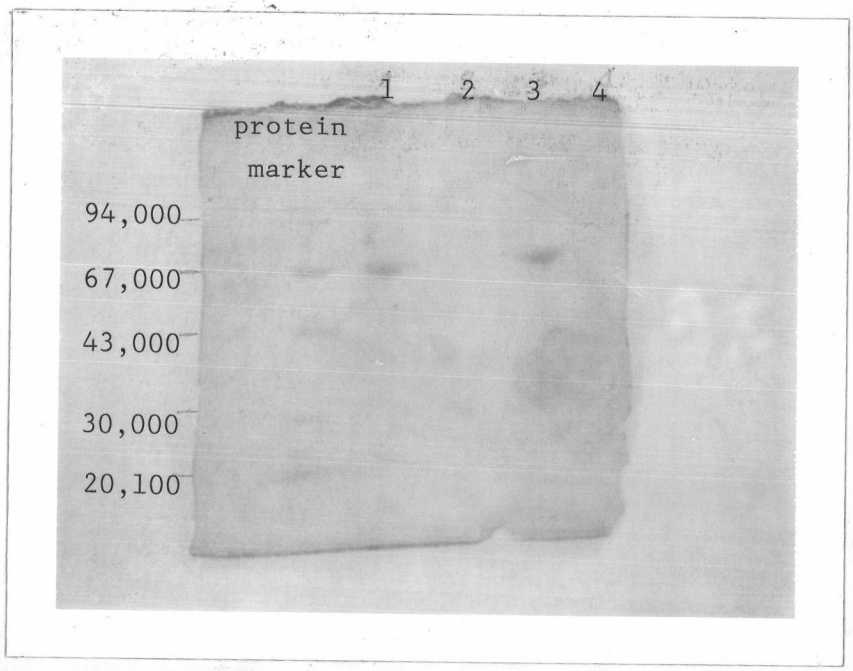


รูปที่ 14 แสดงยูวีสเปกตรัมพีคแรกที่ได้จากการแยกธัยรอกซิน-อัลบูมิน คอนจูเกต

เมื่อนำพีคที่ 2 จากรูปที่ 13 ไปตรวจยูวีสเปกตรัม พบว่าไม่ปรากฏพีคของอัลบูมินยังคงปรากฏแต่พีคของธัยรอกซินเท่านั้น ซึ่งแสดงได้ดังรูปที่ 15 นั่นหมายถึงว่าอัลบูมินถูกใช้หมดในปฏิกริยาการเตรียมคอนจูเกต โดยสามารถยืนยันจากการทำอิเล็กโตรฟอเรซีสดังรูปที่ 16



รูปที่ 15 แสดงยูวีสเปกตรัมพีคที่ 2 จากการแยกธัยรอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกต



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 แสดงผลการทำเจลอิเล็กโตรฟอเรซีส จากการแยกธัยรอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกต

จากรูปที่ 16 แถบที่ 1 และ 2 คือส่วนของพีคที่ 1 และ 2 จากการแยกธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ตามลำดับ แถบที่ 3 และ 4 คือส่วนของพีคที่ 1 และ 2 จากการแยกธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน ตามลำดับ ซึ่งแถบที่ 2 และ 4 ไม่ปรากฏว่ามีอัลบูมินเหลืออยู่โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (protein marker) แสดงว่าอัลบูมินถูกใช้หมดในปฏิกริยา ดังนั้นในการคำนวณหาอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่ออัลบูมิน (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) จำนวนโมลอัลบูมินจะเท่ากับจำนวนโมลเริ่มต้นในปฏิกริยา

ผลของพีเอชที่มีต่ออัตราส่วนโมลธัยรอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกต

เมื่อนำการเปลี่ยนแปลงพีเอชมาพิจารณาร่วมด้วย โดยทดลองเตรียมธัยรอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกตในช่วงพีเอช 7-10.5 ผลแสดงได้ดังตารางที่ 6 ซึ่งพบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการเตรียมธัยรอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกต ที่ให้ค่าอัตราส่วนโมลสูงสุดอยู่ในช่วง พีเอช 9-10

ตารางที่ 6 แสดงผลของพีเอชต่อค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกต

pH / conjugates	7.0	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5
T4-BSA	1-2:1	1-1.5:1	3-4:1	9-10:1	12-14:1	10-11:1	5-6:1
T4-HSA	0.7-1:1	0.8-1:1	1-2.5:1	3-5:1	3-6:1	3-4:1	1-2:1

หมายเหตุ T4-BSA = ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน
T4-HSA = ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน

ผลของปริมาณสารเริ่มต้นและอุณหภูมิที่มีต่ออัตราส่วนโมลธัยรอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกต

เมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเริ่มต้นที่ใช้และทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิต่างกันอัตราส่วนโมล ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินแสดงได้ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลของปริมาณโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินและอุณหภูมิที่ใช้ต่อค่าอัตราส่วนโมล ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน

กรัม (จำนวนโมล)			อัตราส่วนโมล	
ธัยรอกซิน	คาร์โบไดอิมีด	โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน	ที่ 25 °ซ	ที่ 4 ° ซ
0.01 ($1.29x10^{-5}$)	0.004 ($2.09x10^{-5}$)	0.0250 ($3.65x10^{-7}$)	3-6:1	2-3:1
		0.0150 ($2.19x10^{-7}$)	4-6:1	2-4:1
		0.0090 ($1.31x10^{-7}$)	10-12:1	9-10:1
		0.0050 ($0.73x10^{-7}$)	14-16:1	10-14:1
		0.0008 ($0.117x10^{-7}$)	20-22:1	16-18:1

จากตารางที่ 7 พบว่าเมื่อให้ปริมาณธัยรอกซิน และ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอมิโนโพรพิล) คาร์โบไดอิมีด ไฮโดรคลอไรด์ คงที่ และ มากเกินพอแต่เปลี่ยนแปลงปริมาณโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินที่ใช้ ผลปรากฏว่าการใช้อัลบูมินให้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิห้องจะให้ค่าอัตราส่วนโมลสูงกว่าที่อุณหภูมิ 4° ซ

ส่วนอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินแสดงผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลของปริมาณฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินและอุณหภูมิที่ใช้ต่อต่าอัตราส่วนโมล ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน

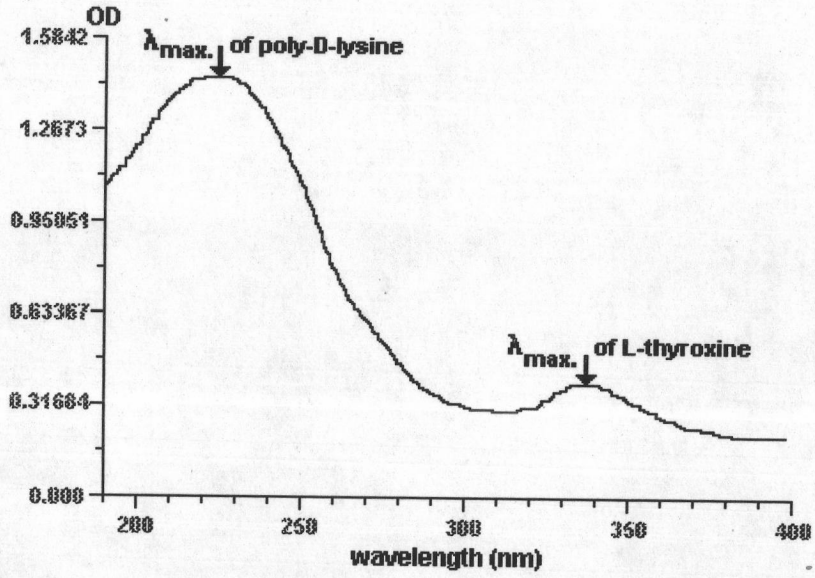
กรัม(จำนวนโมล)			อัตราส่วนโมล	
ธัยรอกซิน	คาร์โบไดอิมีด	ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน	ที่ 25° ซ	ที่ 4° ซ
0.020 ($2.57x10^{-5}$)	0.005 ($2.61x10^{-5}$)	0.2000 ($29.2x10^{-7}$)	2-3:1	4-6:1
		0.0800($11.68x10^{-7}$)	3-5:1	8-10:1
		0.0330 ($4.82x10^{-7}$)	3-4:1	12-15:1
		0.0015 ($0.22x10^{-7}$)	10-14:1	16-18:1
		0.0005 ($0.07x10^{-7}$)	15-16:1	18-20:1

จากตารางข้างต้นพบว่าเป็นไปในทำนองเดียวกับตารางที่ 7 คือการเตรียมให้ได้อัตราส่วนโมลสูงสุดควรใช้ปริมาณอัลบูมินให้น้อยที่สุดต่างกันเพียงว่าอิมมูโนเจนชนิดนี้ต้องเตรียมที่อุณหภูมิ 4 ° ซ จะให้ค่าอัตราส่วนโมลสูงกว่าที่ 25 ° ซ

3.2.2 ธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน

สำหรับธัยรอกซิน คอนจูเกตชนิดนี้ไม่สามารถทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ ด้วยเหตุผลที่ว่าตัวทำละลายไพริดีนที่ใช้ในการเตรียมคอนจูเกตนี้สามารถละลายเจลที่ใช้ในการแยก ทำให้สารที่ได้ไม่บริสุทธิ์จึงใช้การไดอะไลซีสในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.9 % น้ำหนักต่อปริมาตร) 3-5 วัน อัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโพลี-ดี-ไลซีนมีค่า 200 : 1 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก)

เมื่อนำสารที่ผ่านการทำไดอะไลซีสไปตรวจสอบยูวีสเปกตรัม ผลแสดงได้ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 แสดงยูวีสเปกตรัม ธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีนในช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร

3.3 การตอบสนองในสัตว์ทดลอง (Immune Response) ต่ออิมมูโนเจนแต่ละชนิด

3.3.1 อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน

ผลการตอบสนองต่อปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้

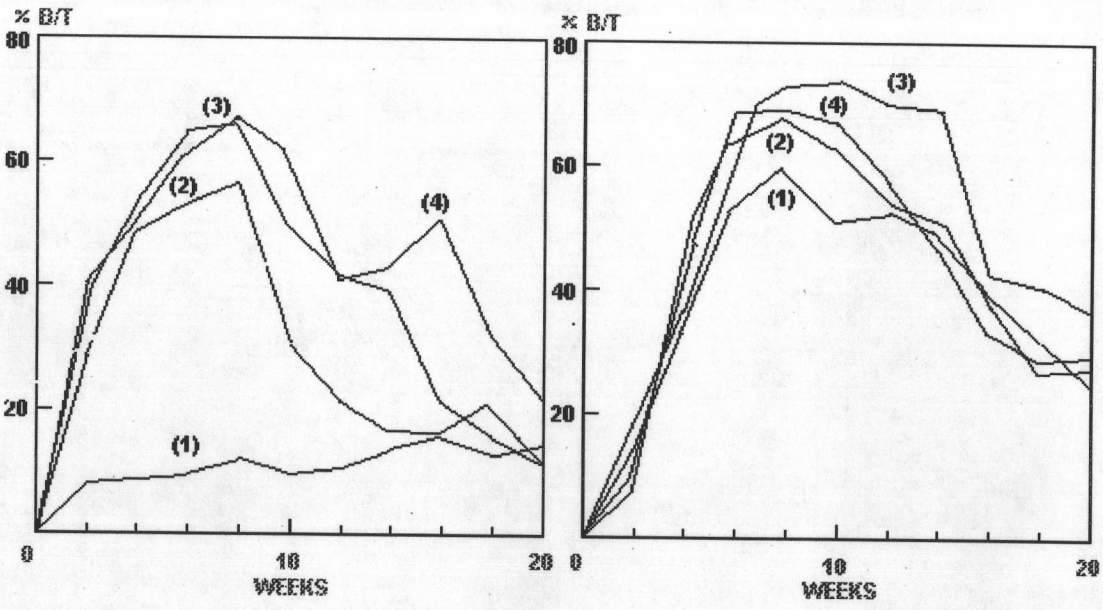
การศึกษาในหัวข้อนี้ใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ที่มีอัตราส่วนโมลสูงสุด คือ 22:1 โดยแบ่งกระต่ายออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว ทั้ง 2 กลุ่มใช้ปริมาณอิมมูโนเจนในการฉีดครั้งแรก (primary injection) เท่ากันคือ 1 มก./ตัว แต่ในครั้งต่อ ๆ มากลุ่มแรกใช้เพียง 0.2 มก./ตัว ในขณะที่กลุ่มที่ 2 ยังคงใช้ 1 มก./ตัว ทั้ง 2 กลุ่มนี้มีช่วงเวลาในการฉีดและเจาะเลือดเท่ากัน คือ ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลของปริมาณอิมมูโนเจนต่อการตอบสนองในสัตว์ทดลอง

กลุ่มที่ 1 (1.0 และ 0.2 มก.)		กลุ่มที่ 2 (1.0 และ 1.0 มก.)	
กระต่าย	ไตเตอร์	กระต่าย	ไตเตอร์
1	1:130	1	-
2	1:230	2	1:140
3	1:400	3	1:300
4	1:220	4	1:270

หมายเหตุ- ไม่มีการตอบสนอง

การตอบสนองดังกล่าวข้างต้น เมื่อนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %B/T ของธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125กับแอนติซีรัมกับระยะเวลา (สัปดาห์) ที่การตอบสนองเริ่มลดลงแสดงดังรูปที่ 18 จะเห็นได้ว่าปริมาณอิมมูโนเจนที่เหมาะสมสำหรับการฉีดครั้งต่อ ๆ มาในการกระตุ้นสัตว์ทดลองซึ่งให้ผลการตอบสนองที่ดีกว่าคือ 0.2 มก.



รูปที่ 18 แสดงผลการใช้ปริมาณอิมมูโนเจนที่ต่างกัน กราฟทางซ้ายแทนกลุ่มที่ใช้อิมมูโนเจน 1 มก. กราฟทางขวาแทนกลุ่มที่ใช้ 0.2 มก. ตัวเลขในวงเล็บคือลำดับที่ของกระต่าย โดยมีระยะการฉีดกระตุ้นเท่ากันคือทุก ๆ 2 สัปดาห์

ผลการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนที่มีค่าอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินต่าง ๆ กัน

ในหัวข้อนี้แบ่งกระต่ายออกเป็น 3 กลุ่ม สำหรับอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กันของอิมมูโนเจน ปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้กระตุ้นเป็นปริมาณเดียวกับที่กล่าวข้างต้นคือ 1 มก.สำหรับการฉีดครั้งแรกและ 0.2 มก.ในการฉีดครั้งต่อมา ผลการตรวจเลือดแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ที่มีค่าอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กัน

กลุ่มที่	ค่าอัตราส่วนโมล	จำนวน (ตัว)	% B/T		
			0-20 %	> 30 < 50 %	> 50 %
1	< 10 :1	8	7	1	-
2	> 10 < 20:1	8	-	6	2
3	> 20 :1	24	18	2	4

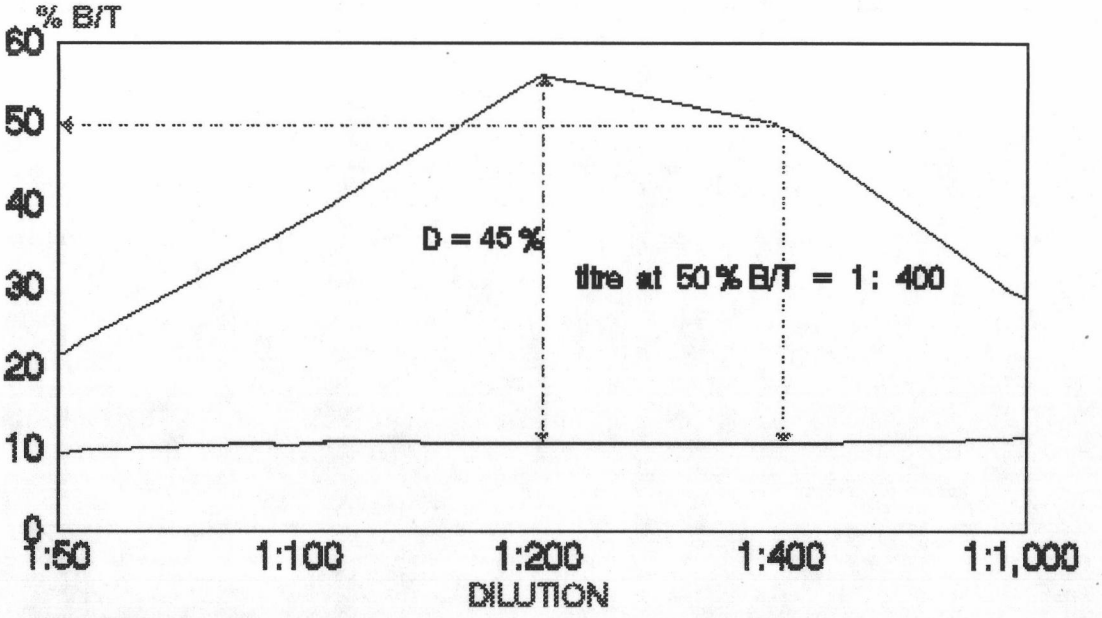
กระต่ายกลุ่มที่มี % B/T > 50 % ค่าไตเตอร์แสดงได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่าไตเตอร์แอนติซีรัมที่มี % B/T > 50 %

กลุ่มที่	ไตเตอร์ *
2	100,130
3	270,300,400,400

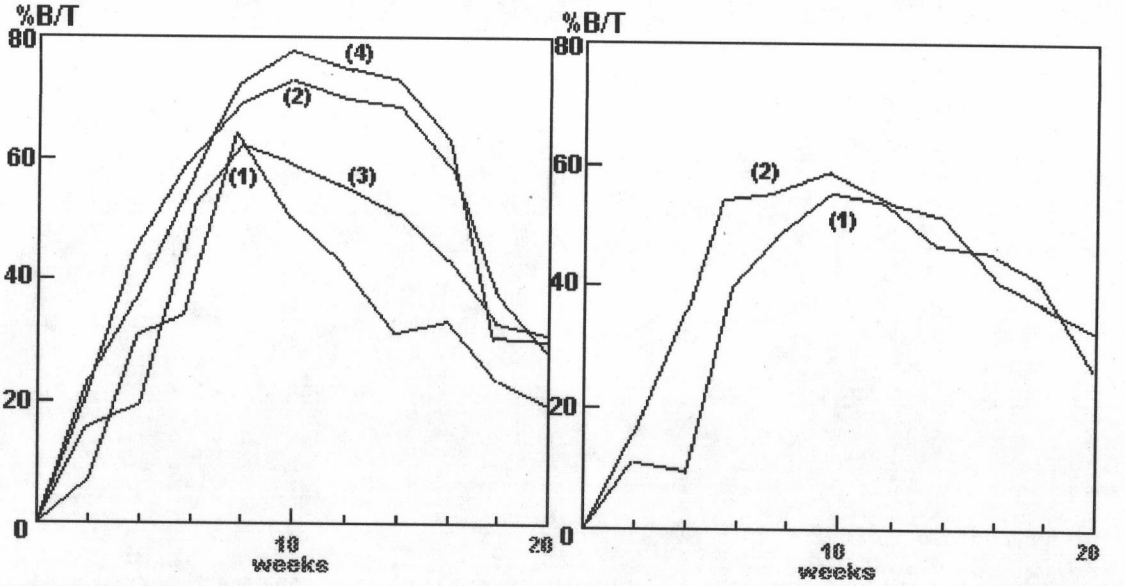
หมายเหตุ ค่าที่ยอมรับได้ต้องมี displacement (D) > 40 % ขึ้นไป

กราฟไตเตอร์ดังกล่าวข้างต้นแสดงดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 แสดงกราฟไตเตอร์แอนติซีรัมที่ใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน

เมื่อนำแอนติซีรัมจากการใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินที่มีอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กันมาเปรียบเทียบการลดลงของการตอบสนอง แสดงได้ดังรูปที่ 20 โดยจะเห็นได้ว่าการลดลงของการตอบสนองของแอนติซีรัมที่ได้จากการใช้ธัยรอกซิน โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินที่มีอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กันมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันแต่ค่าการตอบสนองในรูป % B/T แตกต่างกันโดยอัตราส่วนโมลที่สูงกว่าจะให้ค่าสูงกว่าด้วย



รูปที่ 20 แสดงการลดลงของการตอบสนองจากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินที่มีค่าอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กัน โดยกราฟทางซ้ายแทนกลุ่มที่ใช้อัตราส่วนโมล > 20 : 1 กราฟทางขวาใช้ค่าอัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1 และมีระยะเวลาการฉีดกระตุ้นเท่ากันคือทุก ๆ 1 เดือน

ผลการตอบสนองเมื่อให้ระยะเวลาการฉีดกระตุ้นต่างกัน

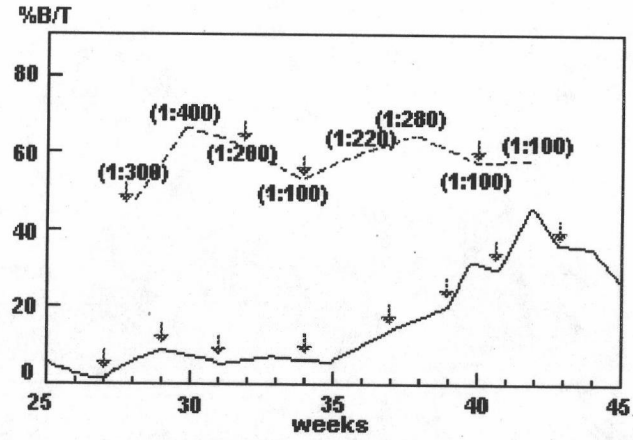
เมื่อนำกระต่ายที่เคยได้รับการกระตุ้นดังกล่าวข้างต้นมากระตุ้นซ้ำอีก โดยกลุ่มแรกมีระยะเวลาในการฉีดทุก ๆ 2 สัปดาห์ ส่วนกลุ่มที่ 2 มีระยะเวลาในการฉีดประมาณ 1 เดือน ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มใช้อิมมูโนเจนชนิดเดียวกันและมีค่าอัตราส่วนโมลเท่ากัน ผลการตรวจเลือดแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลการติดตามการตอบสนองในสัตว์ทดลองที่มีระยะเวลาการฉีดกระตุ้นต่างกัน

ระยะการฉีด	จำนวน (ตัว)	% B/T			ไตเตอร์
		0-20 %	> 30< 50 %	> 50 %	
2 สัปดาห์	4	1	3	-	-*
1 เดือน	4	-	1	3	400 ,300,120

หมายเหตุ * การกระตุ้นในช่วงแรกให้ค่าไตเตอร์สูงสุด 1:400

เมื่อนำผลดังกล่าวมาเขียนกราฟเปรียบเทียบกัน แสดงได้ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 แสดงการเปรียบเทียบการตอบสนองของสัตว์ทดลองที่มีระยะเวลาการฉีดกระตุ้นต่างกัน
โดยเส้นทึบแสดงผลของกระต่ายกลุ่มที่เคยได้รับการกระตุ้นทุก ๆ 2 สัปดาห์
เส้นประแสดงกระต่ายกลุ่มที่เคยได้รับการกระตุ้นทุก ๆ 1 เดือน
ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่าไตเตอร์ที่ตรวจวัดได้ ลูกศรแสดงการฉีดกระตุ้น

จากตารางที่ 12 และรูปที่ 21 แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้เกิดการตอบสนองได้นั้นควรมีระยะห่างพอสมควร ในที่นี้เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการฉีดทุก ๆ 1เดือนกับทุก ๆ 2 สัปดาห์ พบว่าการกระตุ้นทุก ๆ 2 สัปดาห์อาจทำให้เกิดการไม่ตอบสนองต่ออิมมูโนเจนที่ใช้ในระยะยาวได้

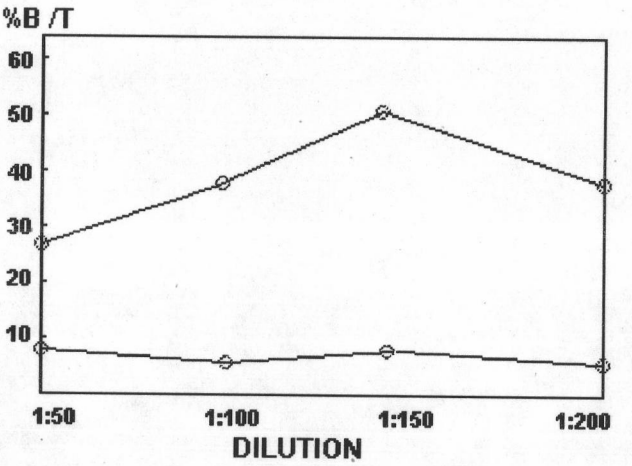
3.3.2 <u>อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน</u>

การใช้อิมมูโนเจนชนิดนี้เป็นไปในทำนองเดียวกับธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน คือใช้กระต่ายกลุ่มละ 8 ตัวแต่แบ่งเป็น 2 กลุ่มเท่านั้นและใช้ปริมาณในการฉีดเท่ากันคือ 1 มก./ตัว สำหรับการฉีดครั้งแรก และใช้ 0.2 มก./ตัว สำหรับการฉีดครั้งต่อไป ผลการตรวจเลือดแสดงดังตารางที่ 13 จะเห็นว่าอิมมูโนเจนที่มีค่าอัตราส่วนโมลสูงสุดจะให้ค่าการตอบสนองในรูปไตเตอร์สูงสุดด้วย

ตารางที่ 13 แสดงผลการตอบสนองในสัตว์ทดลองต่ออิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินที่มีค่าอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กัน

อัตราส่วนโมล	จำนวน	% B/T			ไตเตอร์
		0-20 %	> 30 <50 %	> 50 %	
< 10 :1	8	8	-	-	-
> 10 < 20 :1	24	20	-	4	150,150, 120,100

กราฟไตเตอร์ตารางข้างต้นแสดงได้ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงกราฟไตเตอร์แอนติซีรัมจากการใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน

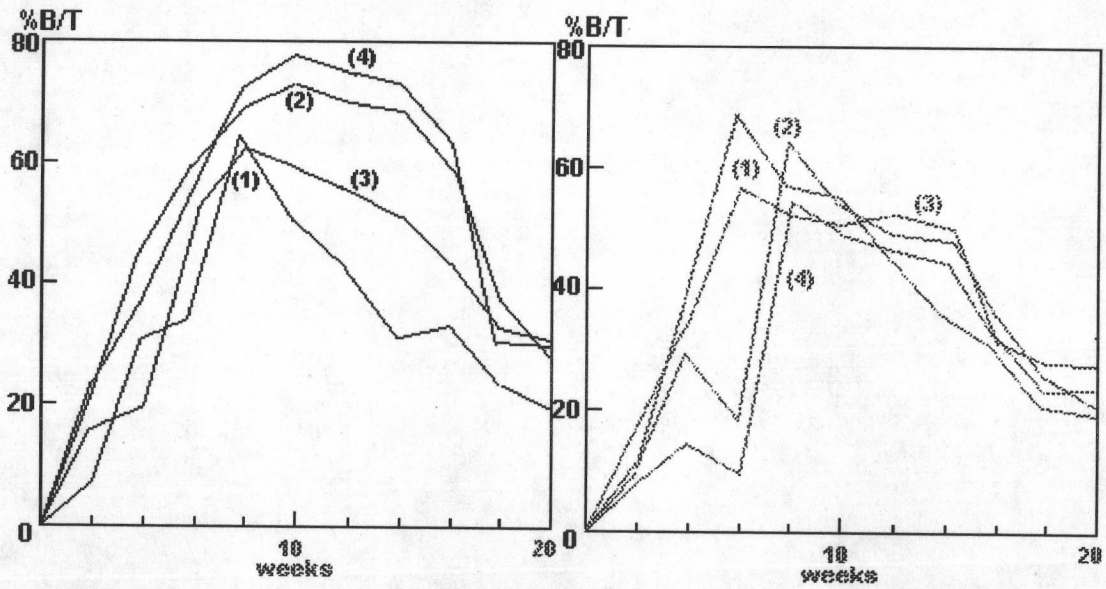
เมื่อนำกระต่ายกลุ่มที่เคยได้รับการกระตุ้นข้างต้นมากระตุ้นซ้ำอีกโดยใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน- ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน ปริมาณ 0.2 มก./ตัว และมีช่วงระยะการฉีดกระตุ้น 1 เดือน ผลการตรวจเลือดแสดงได้ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงผลการติดตามการตอบสนองในสัตว์ทดลองที่เคยมีการตอบสนองต่อ อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน

% B/T	จำนวน (ตัว)
0-20 %	4
> 30 < 50 %	-
> 50 %	-

หมายเหตุ การกระตุ้นในช่วงแรกให้ค่าไตเตอร์สูงสุด 1:150

เมื่อนำแอนติซีรัมที่ได้จากการตอบสนองโดยใช้อิมมูโนเจนต่างชนิดกันมาเปรียบเทียบการลดลงของการตอบสนองแสดงได้ดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงการเปรียบเทียบการลดลงของการตอบสนองที่ใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน อัตราส่วนโมล > 20 : 1 (กราฟซ้าย) เปรียบเทียบกับ อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน < 20 : 1(กราฟขวา) โดยทั้ง 2 กลุ่มมีระยะการฉีดกระตุ้นเท่ากัน คือทุก ๆ 2 สัปดาห์ ตัวเลขแสดงลำดับที่ของกระต่าย

จากตารางที่ 14 และ รูปที่ 23 จะเห็นได้ว่า อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองมีการตอบสนองดีกว่าอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินที่มีระยะเวลาการกระตุ้นเท่ากัน และ เมื่อนำมากระตุ้นซ้ำอีกพบว่ากระต่ายกลุ่มที่กระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินยังคงสามารถเกิดการตอบสนองในสัตว์ทดลองได้

3.3.3 อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน

ในการใช้อิมมูโนเจนชนิดนี้ใช้กระต่ายทั้งหมด 24 ตัว โดยใช้ปริมาณอิมมูโนเจน ,ระยะเวลาการฉีดและเจาะเลือดเท่ากันกับกลุ่มอื่น ๆ ผลแสดงได้ดังตารางที่ 15 อิมมูโนเจนชนิดนี้แม้จะมีค่าอัตราส่วนโมลสูงกว่าอิมมูโนเจนทั้ง 2 ข้างต้น คือ 200 : 1 แต่ก็ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองในสัตว์ทดลองแต่อย่างใด

ตารางที่ 15 แสดงผลการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน

% B/T	จำนวน(ตัว)
0-20 %	24
> 30 < 50 %	-
> 50 %	-

3.4 การศึกษาคุณลักษณะแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (Characterization)

การศึกษาในหัวข้อนี้พิจารณาหาค่าคงที่สัมพรรคภาพ ซึ่งบอกถึงพลังงานของปฏิกริยาการรวมระหว่างแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับธัยรอกซินและศึกษาปฏิกริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้แต่ละกลุ่ม

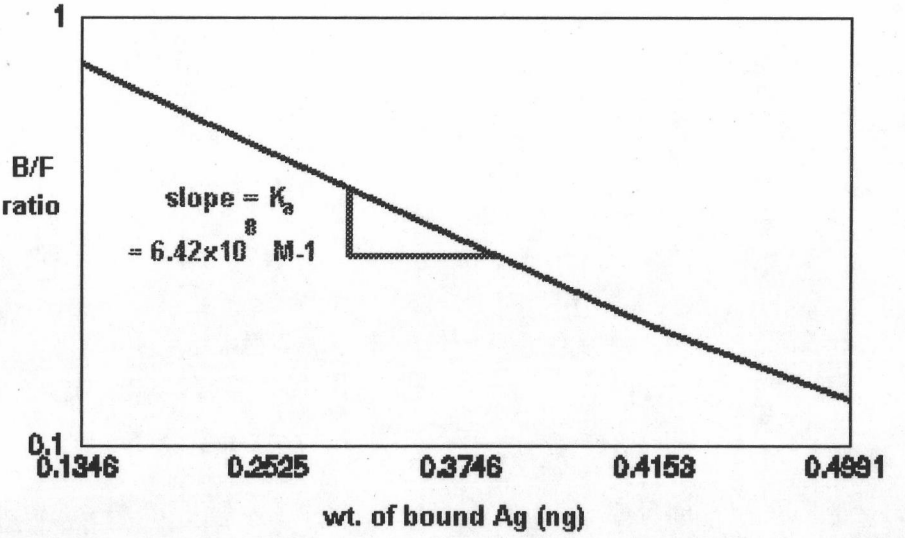
3.4.1 การคำนวณค่าคงที่สัมพรรคภาพของแอนติซีรัมทุกกลุ่ม

เมื่อนำแอนติซีรัมทุกกลุ่มมาทดลองหาค่าคงที่สัมพรรคภาพ ผลการคำนวณ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) แสดงได้ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงค่าคงที่สัมพรรคภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (ต่อโมลาร์)

	T4-BSA		T4-HSA
	> 10 < 20 :1	> 20 :1	> 10 < 20 :1
1	-	4.85×10^8	5.95×10^8
2	-	1.44×10^8	8.68×10^8
3	6.42×10^8	4.69×10^8	3.87×10^8
4	9.51×10^7	7.57×10^9	7.18×10^8

กราฟแสดงค่าคงที่สัมพรรคภาพแสดงได้ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดง Scatchard plot ที่ใช้คำนวณค่าคงที่สัมพรรคภาพ

3.4.2 <u>การศึกษาปฏิกริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้</u>

ในหัวข้อนี้เป็นการศึกษาผลของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงธัยรอกซิน ผลการศึกษาแสดงได้ดังตารางที่ 17

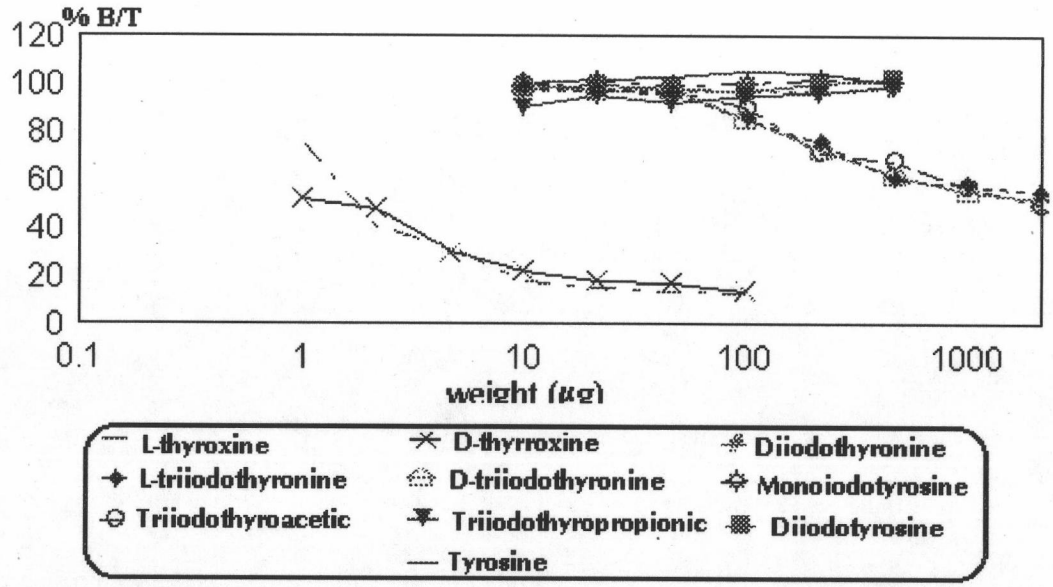
ตารางที่ 17 แสดงผลของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงธัยรอกซินกับแอนติซีรัมที่ได้จาก อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (เปอร์เซนต์)*

	อัตราส่วนโมล					
	> 20 :1				> 10 < 20 :1	
	1	2	3	4	1	2
D-thyroxine	100	97.86	97.93	98.96	98.78	98.88
L-triiodothyronine	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
D-triiodothyronine	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Triiodothyroacetic acid	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Triiodothyropropionic acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Diiodothyronine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Diiodotyrosine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Monoiodotyrosine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Tyrosine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

หมายเหตุ* คิดเทียบกับแอล-ธัยรอกซิน ที่ 50 % B/T

จากตารางที่ 17 เมื่อนำสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ แอล-ธัยรอกซิน มาทำปฏิกริยากับแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการใช้ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมินในการกระตุ้น พบว่าสารที่มีผลมากที่สุดต่อการทำปฏิกริยากับแอนติบอดี คือ ดี-ธัยรอกซิน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 98-100 % ส่วนสารอื่น ๆ มีผลน้อยมาก คือ 0.01 % ส่วนสารที่มีผลต่อแอนติบอดี < 0.01 % คือ ไตรไอโอโดธัยโรโพรพิโอนิก แอซิด , ไดไอโอโดธัยโรนีน, ไดไอโอโดไทโรซีน , โมโนไอโอโดไทโรซีน และ ไทโรซีน

กราฟแสดงผลของปฏิกริยาในตารางที่ 17 แสดงได้ดังรูปที่ 25



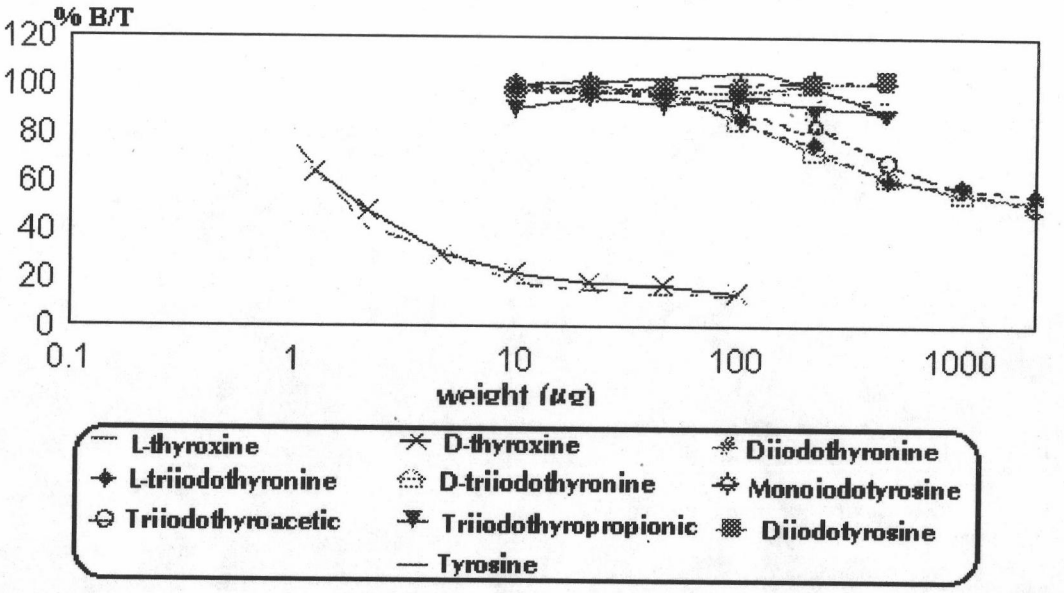
รูปที่ 25 แสดงกราฟปฏิกริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ได้จาก
การใช้ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน

สำหรับแอนติซีรัมที่ได้จากการใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินผลแสดงได้ดังตารางที่ 18 และกราฟรูปที่ 26

ตารางที่ 18 แสดงผลของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงธัยรอกซินกับแอนติซีรัมที่ได้จาก
อิมมูโนเจนธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (เปอร์เซนต์)*

	1	2	3	4
D-thyroxine	98.22	99.37	100	100
L-triiodothyronine	0.01	0.01	0.01	0.01
D-triiodothyronine	0.01	0.01	0.01	0.01
Triiodothyroacetic acid	0.01	0.01	0.01	0.01
Triiodothyropropionic acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Diiodothyronine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Diiodotyrosine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Monoiodotyrosine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Tyrosine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

หมายเหตุ *คิดเทียบกับแอล-ธัยรอกซิน ที่ 50 % B/T



รูปที่ 26 แสดงกราฟปฏิกริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ได้จาก
การใช้ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน

ปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดีที่ได้จากการใช้ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินเป็นอิมมูโนเจนกับกลุ่มสารดังตารางที่ 18 พบว่าสารที่มีค่า % B/T รองจากแอล-ที4 เมื่อจับกับแอนติบอดีแล้ว ได้แก่ ดี-ธัยรอกซิน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 98-100 % ส่วนสารอื่น ๆ มีผลน้อยมาก คือ 0.01 % สารที่มีผลต่อแอนติบอดี < 0.01 % คือ ไตรไอโอโดธัยโรโพรพิโอนิก แอซิด , ไดไอโอโดธัยโรนีน, ไดไอโอโดไทโรซีน , โมโนไอโอโดไทโรซีน และ ไทโรซีน